

ZUR DARSTELLUNG UND BILDUNGSWEISE
VON IN VITRO AKTIVEN 5.6- UND
5.8-CHINOLINDIONEN MALARIAWIRKSAMER
6- UND 8-AMINOCHINOLINE

Ein Beitrag zur Schönhöfer'schen Chinon-Hypothese

von

Wolfgang Steuding
aus Erfurt/Thür.

1976 № 4 63



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546228_0082

ZUR DARSTELLUNG UND BILDUNGSWEISE
VON IN VITRO AKTIVEN 5.6- UND
5.8-CHINOLINDIONEN MALARIAWIRKSAMER
6- UND 8-AMINOCHINOLINE

Ein Beitrag zur Schönhöfer'schen Chinon-Hypothese



Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Wolfgang Steuding
aus Erfurt/Thür.

Als Dissertation genehmigt
von den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 24. November 1976

Vorsitzender der Promotionskommission :	Professor Dr. H. Remmert
Erstberichterstatter :	Professor Dr. O. Dann
Zweitberichterstatter :	Professor Dr. H. Hofmann

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1972 bis Mai 1976 im Institut für Angewandte Chemie, jetzt Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, der Universität Erlangen-Nürnberg, ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. O. Dann, danke ich sehr herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, für seine fördernde Unterstützung und für das mir stets entgegengebrachte Verständnis.

Für zahlreiche wertvolle Ratschläge danke ich auch Herrn Professor Dr. P. Nickel.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Zusammenfassung	1
A. <u>Theoretischer Teil</u>	
1. <u>Ausgangspunkt, Zielsetzung und Ergebnisse</u> <u>der Untersuchungen</u>	3
1.1. <u>Malariawirksame Aminochinoline</u>	3
Abb. 1	4
1.2. <u>Theorie über die Wirkungsweise der 4-, 6- und 8-</u> <u>Aminochinoline</u>	6
1.2.1. Die Schönhöfer'sche Chinon-Hypothese	6
1.2.2. Bisherige Befunde, die für die Richtigkeit der Chinon-Hypothese sprechen	6
1.2.2.1. Bei den 8-Aminochinolinen	6
1.2.2.2. Bei den 6-Aminochinolinen	9
1.2.3. Basisch alkylierte Aminochinoline mit tertiärer Aminogruppe	11
1.2.4. 8- und 6-Aminochinoline mit substituierter 7-Stellung ..	12
1.3. <u>Zielsetzung der Untersuchungen</u>	13
1.4. <u>Ergebnisse der Untersuchungen</u>	15
1.4.1. In vivo- und in vitro-Aktivität einiger 5,6-, 5,8- und 7,8-Chinolindione, 2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon, Primaquine und Ni 147/36 gegen P. vinckei in der Maus	15
Tab. 1	16
Abb. 2	17
1.4.2. Erweitertes Metabolisierungsschema der 8-Amino-6- methoxy-chinoline	18
Abb. 3	19
1.4.3. Extraktionsbedingungen für die Chinolindione	20
Abb. 4	21

1.4.4.	Gas-chromatographische Bestimmung der 5,6-Chinolindione 2 und 7 als Metaboliten von Ni 147/36 und Plasmochin ^(R) im Urin der Maus	22
1.4.4.1.	Wahl der Methode	22
1.4.4.2.	Gas-Chromatographie	23
1.4.4.2.1.	Der stickstoffselektive Detektor (NsFID)	23
1.4.4.2.2.	Chromatographiesäulen	24
1.4.4.2.3.	GC der nicht basisch alkylierten Chinolindione	24
	Tab. 2	26
1.4.4.2.4.	GC der basisch alkylierten Chinolindione	26
1.4.4.2.5.	Innere Standards	27
1.4.4.3.	Ergebnisse	28
	Tab. 3	28
1.4.5.	In vivo N-Entäthylierung von basisch alkylierten 6-Aminochinolinen mit tertiärer 6-Aminogruppe in der Maus	29
1.4.6.	Inkubation basisch alkylierter 6- und 8-Aminochinolone mit Gewebeschnitten der Mäuseleber	30
1.4.6.1.	Wahl der Methode	30
1.4.6.2.	Darstellung und Prüfung der Leberschnitte	30
1.4.6.3.	Durchführung	31
1.4.6.4.	Ergebnisse	31
	Abb. 5	33
1.4.7.	Nachweis des p-Chinons 3a in Mäuseleber nach i. p. Gabe von Ni 147/36 (1a)	35
1.4.7.1.	Ergebnis	35
	Abb. 6	36
1.4.8.	Autoxidation von basisch alkylierten 5-, 6- und 8-Aminochinolinen und von 6-(2-Diäthylamino-äthoxy)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin durch Luftsauerstoff	37
1.4.8.1.	Ausgangspunkt	37

1.4.8.2.	Durchführung	37
1.4.8.3.	Ergebnisse	38
	Abb. 7	39
1.5.	<u>Zusammenfassung der Ergebnisse und Folgerung</u>	41
2.	<u>Chemisch-theoretischer Teil</u>	43
2.1.	<u>Bisher bekannte 5.6- und 5.8- Chinolindione</u>	43
2.1.1.	5.6-Chinolindione	43
2.1.2.	5.8-Chinolindione	43
2.1.3.	Basisch alkylierte 8-Amino- 5.6- chinolindione	44
2.1.4.	Basisch alkylierte 6-Amino- 5.8- chinolindione	45
2.2.	<u>Oxidation von basisch alkylierten 6- und 8- Amino- chinolinen mit Kaliumhexacyanoferrat (III)</u>	45
2.2.1.	Oxidation von 6-Aminochinolinen	45
2.2.2.	Oxidation von 8-Aminochinolinen	46
	Formelschema 1	47
2.3.	<u>Oxidative Ätherspaltung mit Silber (II) oxid</u>	48
2.4.	<u>Pyrido [3.2-a] phenazine</u>	49
2.5.	<u>6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2.4- dimethyl-5.8-chinolindion (3a)</u>	50
	Formelschema 2	52
2.6.	<u>Versuche zur Reduktion von N-acetyliertem Plasmochin^(R)</u>	54
	Formelschema 3	55
2.7.	<u>5.7.8 -Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin</u>	57
2.7.1.	Ringschluß nach A. Combes	57
2.7.2.	Ausgangsverbindungen	58
2.7.3.	Versuche zur Darstellung von 5.7.8 -Trimethoxy-2.4- dimethyl-6-nitro-chinolin bzw. 6-Amino-5.7.8-trimeth- oxy-2.4-dimethyl-chinolin	58
	Formelschema 4	59

2.8.	<u>IR -Spektren</u>	61
2.8.1.	5,6- und 5,8- Chinolindione	61
	Abb. 8	62
2.9.	<u>UV -Spektren</u>	64
2.9.1.	Chinolindione	64
	Abb. 9	65
2.9.2.	Pyrido [3,2-a] phenazine	66
	Abb. 10	67
2.10.	<u>Massenspektren</u>	68
2.10.1.	Chinolindione	68
	Fragmentierungsschema 1	69
2.10.2.	Pyrido [3,2-a] phenazine	70
	Fragmentierungsschema 2	71
2.10.3.	Umsetzungsprodukte aus der Behandlung von 5,7,8- Trimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (24) mit Acetan- hydrid / rauchende Salpetersäure	72
 B. <u>Experimenteller Teil</u>		73
1.	<u>Präparative Versuchsbeschreibungen</u>	73
1.1.	<u>Allgemeine Angaben</u>	73
1.2.	<u>5,6- und 5,8-Chinolindione</u>	76
	8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2)	76
	6-Methoxy-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (15)	77
	a) aus 6-Chlor-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (11) ..	77
	b) aus 8-Amino-6-methoxy-2,4-dimethyl-chinolin (12)	77
	7-Methoxy-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (25)	79
	8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-chinolin- dion (7)	80
	a) Oxidation von 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl- amino)-5,6-dimethoxy-chinolin (5) mit Kaliumhexa- cyanoferrat (III) im Alkalischen	80

b) Oxidation von 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl-amino)-5,6-dimethoxy-chinolin (5) mit Kaliumhexacyanoferrat (III) im Sauren	61
6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (1a)	62
a) aus 6-Methoxy-2,4-dimethyl-chinolindion (15)	62
b) aus 2,4-Dimethyl-5,8-chinolindion (10)	63
Oxidation von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (1a) bzw. 6-N-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl)-N-äthyl-amino-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (1b) mit AgO	64
Oxidation von 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-dimethoxy-chinolin (5) mit AgO	65

1.3. Pyrido [3,2-a] phenazine

Umsetzungen von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) mit o-Phenylendiamin	67
a) in Äthanol zur Darstellung von 1,3-Dimethyl-5-methoxy-pyrido [3,2-a] phenazin (4a)	67
b) in Eisessig zur Darstellung von 5-(2-Amino-anilino)-1,3-dimethyl-pyrido [3,2-a] phenazin (4b)	68
5-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-pyrido [3,2-a] phenazin	69
5-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-pyrido [3,2-a] phenazin-naphthalin-1,5-disulfonat	70
Versuche zur Darstellung von Pyrido [3,2-a] phenazin .	91

1.4. Versuch zur Darstellung von 8-N-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl)-N-äthylamino-6-methoxy-chinolin

8-N-Acetyl-N-(4-diäthylamino-1-methyl-butyl)-amino-6-methoxy-chinolin (17)	91
Reduktionsversuch von 8-N-Acetyl-N-(4-diäthylamino-1-methyl-butyl)-amino-6-methoxy-chinolin	92

1.5.	<u>Versuche zur Nitrierung von 5.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (24)</u>	94
1.5.1.	Ausgangsverbindungen	94
	1.3.4-Trimethoxy-5-nitro-benzol (21)	94
	2.3.5-Trimethoxy-anilin (22)	94
	5.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (24)	95
1.5.2.	Erfolglose Nitrierversuche	96
2.	<u>Analytische Arbeitsvorschriften</u>	100
2.1.	<u>Allgemeine Angaben</u>	100
2.1.1.	Geräte	100
2.1.2.	Materialien und Reagenzien	102
2.1.3.	Reinigung der Glasgeräte	103
2.1.4.	Dünnschichtchromatographie	103
2.1.5.	Gas-Chromatographie	104
2.1.5.1.	Trennsäulen	104
2.1.5.2.	Temperatureinstellungen am Gas-Chromatographen ..	105
	Tabelle 5	105
2.1.5.3.	Einstellung der Gase	106
	Tabelle 6	106
2.1.5.4.	Einstellungen am Integrator	106
2.1.5.5.	Vorbereitung der gas-chromatographischen Apparatur	106
2.1.5.6.	Linearität des stickstoffselektiven Detektors	107
	Abb. 11	107
	Abb. 12	107
2.1.5.7.	Auswertung der gas-chromatographischen Analysen ...	108
2.1.5.7.1.	Qualitative Auswertung	108
	Tabelle 7	109
	Tabelle 8	110
2.1.5.7.2.	Halbquantitative Auswertung	111
2.1.6.	Spektrophotometrische Bestimmung der Verteilungs- koeffizienten	113
2.1.7.	Anreicherung der Chinolindione	114

2.1.8.	Versuchstiere	115
2.1.9.	Herstellung der Leberschnitte	115
2.1.10.	Inkubationslösung	116
2.1.11.	Inkubationsapparatur	117
2.1.12.	Herstellung und Applikation der Injektionslösungen für die in vivo-Versuche	117
2.1.13.	Herstellung der Lösungen für die in vitro-Versuche ...	117
2.2.	<u>Tierversuche</u>	119
2.2.1.	Nachweis von 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)- 5,6-chinolindion (7) nach Plasmochingabe im Urin der Maus mittels DC und GC	119
2.2.2.	Nachweis von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolin- dion (2) nach Gabe von Ni 147/36 (1a) bzw. dessen N-Äthyl-Analogen 1b im Urin der Maus mittels DC und GC	120
2.2.3.	In vivo N-Entäthylierung von 6-N-(4-Diäthylamino-1- methyl-butyl)-N-äthylamino-5,8-dimethoxy-2,4- dimethyl-chinolin (1b)	122
2.3.	<u>Leberschnittversuche</u>	123
2.3.1.	Überprüfung der O-Demethylierungsfähigkeit der Leberschnitte mit o- und p-Nitroanisol	123
2.3.2.	Inkubation von Leberschnitten mit Ni 147/36 (1a) und Plasmochin ^(R) (16)	123
2.3.2.1.	Inkubation	123
2.3.2.2.	Vergleichsansätze	124
2.3.2.3.	Extraktion	124
2.3.2.4.	DC	125
2.3.2.5.	Zusätzliche Auswertung durch GC und UV- Spektroskopie	126
2.3.3.	Nachweis von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)- 2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (3a) in der Leber der Maus nach i.p.-Gabe von Ni 147/36 (1a)	126

2.4.	<u>Autoxidationsversuche</u>	128
2.4.1.	Autoxidation wäßriger Lösungen basisch alkylierter 5-, 6- und 8-Aminochinoline und 6-(2-Diäthylamino- äthoxy)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (29) ...	128
2.4.2.	Inkubation	128
2.4.3.	Extraktion	128
2.4.4.	DC, GC und UV-Spektroskopie	128
Literaturverzeichnis		129

ZUSAMMENFASSUNG

6-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) und 6-(4-D.äthylamino-1-methyl-butylamino)-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (3a), die nach der Schönhöfer'schen Chinon-Hypothese vermutlich wirksamen Metaboliten von 6-(4-D.äthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (1a), wurden nach verschiedenen Verfahren synthetisiert; desgleichen wurde 8-(4-D.äthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-chinolindion (7) als ein wahrscheinlich wirksamer Metabolit des Plasmochins^(R) dargestellt. Die 5,6-Chinolindione 2 und 7 wurden durch Umsetzung mit o-Phenylendiamin in die entsprechenden gas-chromatographierbare Parao [3,2-a] phenazine übergeführt, wobei bei der Reaktion von 2 als Nebenprodukt 5-(2-Amino-anilino)-1,3-dimethyl-pyrido [3,2-a] phenazin (4b) erkannt wurde.

Bei der Umsetzung von 5,7,8-Trimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (24) mit 40proz. Salpetersäure bildete sich 7-Methoxy-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (25); bei der Umsetzung mit dem Gemisch von Acetanhydrid und rauchender Salpetersäure entstanden 5-Acetoxy-8-hydroxy-7-methoxy-2,4-dimethyl-chinolin (26) und wenig 5-Acetoxy-8-hydroxy-7-methoxy-4-methyl-chinaldinsäure (27).

Im Urin von mit 6-N-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl)-N-äthylamino-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (1b) i.p. behandelten Mäusen konnte das N-entäthylerte 6-Aminochinolin 1a dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen werden.

Die Bildung von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) und 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-chinolindion (7) im Urin der Maus wurde in vivo und in vitro halbquantitativ verfolgt. Das 6-Amino-chinolin 1a sowie Plasmochin^(R) wurden mit Gewebeschnitten der Mäuseleber unter Sauerstoffzufuhr inkubiert. In den Extrakten konnten die

Chinolindione 2 und 3a sowie 7 nachgewiesen werden, ebenso wie in Vergleichsansätzen ohne Zugabe von Gewebeschnitten.

In einem in vivo -Versuch wurde in Leber von Mäusen nach i.p. Gabe von 1a das p-Chinon 3a dünnschichtchromatographisch nachgewiesen, nicht jedoch das o-Chinon 2.

Wäßrige Lösungen von basisch alkylierten 5-, 6- und 8-Aminochinolinen unterliegen der Autoxidation an der Luft, wobei unter anderem Chinolindione entstehen.

A. THEORETISCHER TEIL

1. Ausgangspunkt, Zielsetzung und Ergebnisse der Untersuchungen

1.1. Malaria wirksame Amino chinoline

Als erstes gametocid und gewebeschizontocid wirkendes synthetisches Malariamittel wurde im Jahre 1924 von W. Schulemann, F. Schönhöfer und A. Wingler^{106,105)} Plasmo chin^(R), ein basisch alkylisiertes 8-Amino chinolin bei den Farbenfabriken Bayer dargestellt. Seine Entdeckung war der Beginn einer intensiven Suche nach weiteren Chemotherapeutika gegen Malaria.

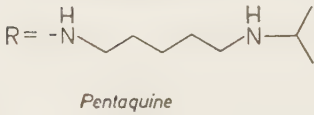
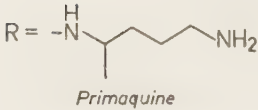
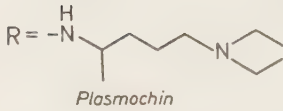
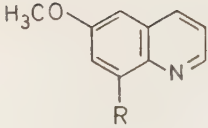
Mit dem Atebrin^(R), einem Acridinderivat, das H. Maus und F. Mietzsch^{71,72)} 1932 bei Bayer synthetisierten, wurde ein gegen alle asexuelle erythrocytären Formen hervorragend wirkendes Mittel entdeckt, das Chinin voll ersetzen kann.

Wenig später wurden dann auch in der 4-Amino chinolin-Reihe malaria wirksame Derivate entwickelt; so von H. Andersag^{5,57,58)} das Reso chin^(R) und das Samo chin^(R), dem bei den Farbenfabriken Bayer zunächst der Vorzug gegeben worden war. Erst 1949 kam Reso chin^(R) unter der Bezeichnung Chloroquine in den USA in den Handel.

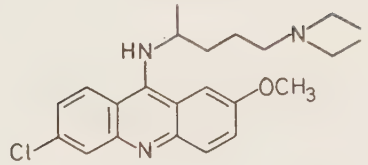
Als Mitte der vierziger Jahre klar wurde, daß Chloroquine Resistenzen mit Plasmodium vivax infizierten Patienten nicht verhindern kann, erinnerte man sich der Berichte, welche die völlige Aushellung einer Plasmodium vivax -Infektion mit einer kombinierten Gabe von Plasmo chin^(R) und Chinin beschrieben hatten. Da sich in erneuten Versuchen^{4,12,38,41,99)} diese Kombination als zu toxisch für den praktischen Gebrauch erwies, was auf der notwendigen hohen Dosierung des Plasmo chins^(R) beruhte wandte sich in den USA das Interesse wieder den 8-Amino chinolinen zu. Aus einem groß angelegten Syntheseprogramm gingen zunächst Pentaquine^(R) 34,36,39,2) und dann vor allem Primaquine^(R) 37) als ver-

Abb. 1: Malariawirksame 4-, 6- und 8-Aminochinoline

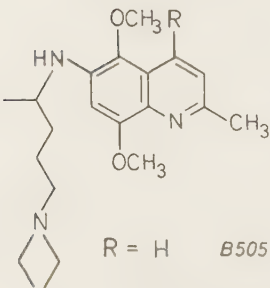
8-AMINOCHINOLINE



ATEBRIN



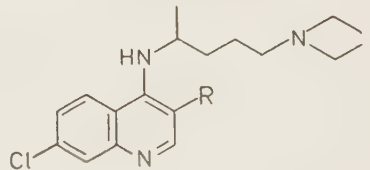
6-AMINOCHINOLINE



$\text{R} = \text{H}$ B505

$\text{R} = \text{CH}_3$ Ni147/36

4-AMINOCHINOLINE



$\text{R} = \text{H}$ Resochin, Chloroquine

$\text{R} = \text{CH}_3$ Santochin

träglicheres und wirksameres, heute gebräuchliches 8-Aminochinolin hervor.

Malariawirksame Substanzen wurden auch in der 6-Aminochinolin-Reihe gefunden. So zeigte das zu Plasmochin^(R) isomere 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-8-methoxy-chinolin¹⁰¹⁾ eine, wenn auch mäßige Wirkung im R o e h l'schen Kanarienvogeltest gegen Plasmodium relictum. Durch Einführen einer zweiten Methoxygruppe in p-Stellung, d.h. in 5-Stellung zur bereits vorhandenen, erhielten F. Schönhöfer und W. Schulemann¹⁰²⁾ 1959 eine Verbindung mit wesentlich höherer Malariawirksamkeit. Durch Einführung einer Methylgruppe in 2-Stellung (B 505) konnte 1960 die hohe akute Toxizität bei Kanarienvögeln etwas gesenkt werden. P. Nickel^{79, 42)} führte, in Fortsetzung der Arbeiten von F. Schönhöfer, eine weitere Methylgruppe in die 4-Stellung ein und erhielt 1969 mit Ni 147/36 (1a) eine Verbindung, die bei ausgezeichneter Wirkung eine weitere Verringerung der akuten Toxizität zeigte. In der Folgezeit wurden die verschiedensten Derivate der 6-Aminochinoline durch Änderungen in der basischen Seitenkette^{103, 93, 40, 83, 68)} und durch Variationen im Substitutionsmuster im Pyridinring^{79, 107, 83)} und im Benzolring^{55, 107, 53)} erhalten und auf ihre Wirksamkeit bei Kanarienvogel- und Mäusemalaria geprüft. Daß das Interesse an den 6-Aminochinolinen, die bei der experimentellen Vogel- und Nagetiermalaria sowohl kausalprophylaktische als auch schizontozide Wirkung zeigen und so zwischen den 8- und 4-Aminochinolinen zu stehen scheinen, weiterhin groß ist, zeigen die letzten Veröffentlichungen von C. Temple Jr. et al.^{118 a, b)}.

1.2. Theorie über die Wirkungsweise der 4-, 6- und 8-Aminochinolone

1.2.1. Die Schönhöfer'sche Chinon-Hypothese

In seiner Veröffentlichung¹⁰¹⁾ "Über die Bedeutung der chinoiden Bindung in Chinolinverbindungen für die Malariawirkung" hat F. Schönhöfer auf Grund seiner umfangreichen Untersuchungen und Beobachtungen die Vermutung ausgesprochen, daß nur solche Chinolinderivate eine Wirkung gegen Malariaparasiten aufweisen können, die "im Organismus unter den vielfältigen Umsetzungsmöglichkeiten biologischer Art dadurch leicht in Reaktion treten können, daß sie, vielleicht nur vorübergehend, in Verbindungen mit chinoider Struktur umwandelbar sind". Diese Arbeitshypothese hat sich bei der Auffindung von malariewirksamen Chinolinen in der Folgezeit bewährt.

Chinoide Strukturen, in Schönhöfer's Sinne, können nur solche Amino-chinolone ausbilden, deren substituierte sekundäre Aminogruppe in ortho- oder para-Stellung zum Chinolinstickstoff steht, also entweder in 4-, 6- oder 8-Stellung. Bei den 4-Aminochinolinen liegt eine solche chinoide Struktur auf Grund der Tautomerie zwischen 4-Aminochinolin und 4-Imino-chinolon stets vor, und diese Chinolonstruktur wurde von F. Schönhöfer auch als mögliche Wirkform in vivo angesehen. Bei den 6- und 8-Aminochinolinen können dagegen chinoide Strukturen erst durch eine oxidative Umwandlung entstehen.

1.2.2. Bisherige Befunde, die für die Richtigkeit der Chinon-Hypothese sprechen.

1.2.2.1. Bei den 8-Aminochinolinen

R.W. Berliner¹¹⁾ und E.S. Josephson und Mitarb.⁵¹⁾ stellten bei Plasmochin^(R), Q.M. Geiman⁴⁷⁾ bei Pentaquine^(R) und Iso-pentaquine^(R) fest, daß diese 8-Aminochinolone in vitro wirkungslos sind,

B.B. Brodie und S. Udenfriend²⁰⁾ gewannen Hinweise für das Vorhandensein von zwei Metaboliten des Plasmochins^(R) im Urin und Plasma von Mensch und Hund, und sie wiesen ihnen die Strukturen eines in der 5-Stellung hydroxylierten Plasmochins^(R) und eines Chinonimins zu. Josephson und Mitarb.⁶⁰⁾ konnten im Urin von mit Plasmochin^(R) behandelten Hähnchen das 5,6-Chinolindion⁷ als Phenazinderivat nachweisen und mit einem von R.C. Elderfield und E. Werbel³⁹⁾ durch Ultraviolett-Bestrahlung von Plasmochin^(R) gewonnenen synthetischen Produkt spektroskopisch vergleichen⁶¹⁾. Dieselbe Arbeitsgruppe⁵⁰⁾ fand jedoch das gleiche Chinon nach in vitro-Inkubation von Plasmochin^(R) im Urin von Hähnchen. C.C. Smith¹¹⁴⁾ konnte mit Hilfe von ¹⁴C-markiertem Pentagastrin^(R) im Affen nachweisen, daß die markierte 6-Methoxygruppe sehr rasch demethyliert wird. Er und später A.R. Tarlov¹¹⁷⁾ stellten ein Schema für den Metabolismus der 8-Aminochinoline auf; danach wird zunächst die 6-Methoxygruppe demethyliert, gefolgt von einer Hydroxylierung in der 5-Stellung; das 5,6-Dihydroxyderivat geht leicht, wie N.L. Drake und Y.T. Pratt³³⁾ durch Behandlung mit Sauerstoff in alkalischer Lösung zeigten, in das 5,6-Chinolindion über. Diese leicht oxidierbaren 6-Hydroxy- und 5,6-Dihydroxyderivate der 8-Aminochinoline sind nach Greenberg und Mitarb.⁵¹⁾ im Gegensatz zu Pentagastrin^(R) in vitro gegen erythrozytäre Formen von *P. gallinaceus* wirksam; eine wesentlich schwächere Aktivität zeigen die Hydroxyderivate dagegen in vivo. Ebenfalls als in vivo nur schwach wirksam, jedoch hoch toxisch für Maus und Hühnchen erwiesen sich die von F.J. Bullock und J.F. Tweedie²²⁾ dargestellten 8-Dialkylamino-5,6-chinolindione, für welche eine in vitro-Wirksamkeit nicht angegeben ist.

Daß derselbe Metabolit für die Wirkung gegen Malariaparasiten, als auch für die toxische Wirkung der 8-Aminochinoline, Hämolyse und Methämoglobininbildung, verantwortlich zu machen ist, vermuteten B.B. Brodie und S. Udenfriend²⁰⁾, veranlaßt durch die Tatsache, daß eine Wirksamkeitssteigerung in der Regel auch eine Erhöhung der Giftigkeit

bedingte. Es wurde vermutet, daß der Metabolit als Chinon und damit als Elektronenakzeptor in Reduktionsprozesse des NADP im Erythrozyten eingreifen könnte. Einer dieser Reduktionsprozesse ist die Bildung von reduziertem Glutathion (GSH), das u. a. Hämoglobin gegen Oxidation schützt^{121, 117)}.

A. S. Al v i n g und Mitarb.³⁾ stellten eine Reihe von Befunden, die für die Chinon-Hypothese und für das parallele Wirk- und Toxizitätsprinzip sprechen, eindrucksvoll zusammen: 1. Der Plasmaspiegel an unverändertem 8-Aminochinolin steht nicht in Korrelation mit der Malaria-wirksamkeit; 2. Die kausalprophylaktische Wirkung ist dann am größten, wenn das 8-Aminochinolin zwölf Stunden vor der Infektion appliziert wird, die maximale Plasmakonzentration ist jedoch bereits 4-6 Stunden nach der Applikation vorhanden; 3. Eine Hämolyse in empfindlichen Organismen beginnt erst nach einer Latenzzeit von 24 oder mehr Stunden nach der Applikation; 4. Der oder die Metabolite, die von Josephson und Mitarb. aus mit Plasmochin^(R) behandelten Hähnchen gewonnen wurden, weisen eine 16fache Aktivität gegen Malariaparasiten und bei der Methämoglobinbildung in vitro auf als Plasmochin^(R) selbst.

Durch Chlor- oder Methylsubstitution der 5-Stellung in 8-Amino-6-methoxy-chinolin erhielt G. R. C o a t n e y²⁸⁾ Verbindungen, deren Verträglichkeit zwar besser war, deren Wirksamkeit gegen *P. gallinaceum* im Hühnchen jedoch stark abnahm. K. C. B l a n c h a r d¹⁴⁾ vermutete, im Einklang mit der Schönhöfer'schen Chinon-Hypothese, daß ein Substituent in der 5-Stellung die Wirksamkeit immer dann herabsetzt oder aufhebt, wenn er eine Chinonbildung erschwert oder verhindert.

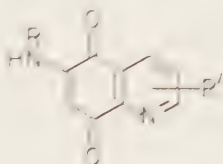
Bei der Prüfung von einundfünfzig neu entwickelten 8-Aminochinolin in der Zeit von 1974-1975 auf curative Wirkung beim Rhesusaffen, infiziert mit Sporozoiten von *P. cynomolgi*, wurde von L. H. S c h m i d t¹³⁶⁾ überraschenderweise gefunden, daß ein in 5-Stellung fluoriertes Prima-

quine-Analoges, 8-(4-Amino-1-methyl-butyl)-amino-5-fluor-6-methoxy-2-methyl-chinolin (WR-215.733), die zweifache Aktivität von Primaquine (Abb. 1) aufwies. Dies steht, fordert man die Bildung von 5.6- bzw. 5.8-Chinolindionen, im Gegensatz zur Schönhöfer'schen Hypothese. C. T e m p l e ¹³⁷⁾ schlug daher eine mögliche Bildung eines 6.7-Chinolindions vor ⁺⁾ (Abb. 3, Weg: D). Voll für die Chinon-Hypothese spricht dagegen, daß im gleichen Laboratorium mit 8-(4-Amino-1-methyl-butyl)-amino-5.6-dimethoxy-4-methyl-chinolin (WR-216.804) ein 8-Aminochinolin mit der vierfachen curativen Aktivität des Primaquine gefunden wurde.

+) 6.7-Chinolindione sind bisher in der Literatur nicht beschrieben.

1.2.2.2. Bei den 6-Aminochinolinen

In Analogie zu den 6-Aminochinolinen postulierten R. B. F. Wagner⁴⁶⁾ und J. Josephson⁴⁷⁾ die Existenz von 5,6-Chinolindion als wasserlösliches, basisch alkyliertes 6-Amino-5,6-chinolindion.



Ein solches 5,6-Chinolindion konnte jedoch bis heute nicht nachgewiesen werden, dagegen wurde auch in der 6-Aminochinolin-Reihe ein 5,6-Chinolindion gefunden⁴⁸⁾.

Nachdem P. Nickel die Oxidierbarkeit einer Reihe von 6-Aminochinolinen mit Kaliumhexacyanoferrat(III) festgestellt hatte⁴¹⁾, gelang es ihm auch, in den Oxidationsansätzen des Ni 147/36 das entsprechende o-Chinon, 3-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2), nachzuweisen und auf diesem Wege zu synthetisieren. Vor kurzem wurde von ihm auch das basisch alkylierte, oben genannte 5,6-Chinolindion in diesen Oxidationsansätzen von Ni 147/36 gefunden⁴¹⁾.

H. Paulus konnte ebenfalls, im Rahmen seiner Untersuchungen, bei Oxidationen einiger 6- und 8-Aminochinolinen und eines 5-Aminochinolins mit Kaliumhexacyanoferrat(III), 5,6-Chinolindione dünnschichtchromatographisch nachweisen⁴⁹⁾. Ihm gelang es auch, dieses (früher als Metabolit von Ni 147/36 im Urin und Exkrementen von Mäusen dünnschichtchromatographisch und, nach Umsetzung mit o-Phenylendiamin, als Phenazinderivat zu sichern. In Analogie zum frühen Auffinden des 5,6-Chinolindions bei der in vitro-Inkubation von Phenacetin⁴²⁾ in Lösung durch die Arbeitsgruppe von Josephson⁵⁰⁾, fand H. Paulus⁴⁹⁾ das 5,6-Chinolindion des Ni 147/36 auch nach in vitro-Inkubation dieses

6-Aminochinolins in Mäuseurin, so daß damals noch nicht als geklärt betrachtet werden konnte, ob es in vivo einer aktiven Stoffwechselleistung bedarf, 8- und 6-Aminochinolins in die betreffenden 5,6-Chinolindione umzuwandeln.

W.-R. Hölzel⁵⁵⁾ stellte durch Änderung des Substitutionsmusters in 5- und 8-Stellung in 6-Amino-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolinen (Ersatz einer Methoxygruppe durch H, CH₃ oder Cl, beider Methoxygruppen durch H) Verbindungen her, deren Oxidation zu p- oder (und) o-Chinonen erschwert bzw. verhindert ist. Die biologische Prüfung gegen Plasmodium vinckei in der Maus ergab, in Übereinstimmung mit der Schönhöfer'schen Chinon-Hypothese, daß eine solche Erschwerung oder Verhinderung einer Chinonbildung im Benzolring zu einer Wirkungsabschwächung bzw. zu einem totalen Wirkungsverlust führt. Die Blutspiegelkurven dieser 6-Aminochinolins verglich H. Paulus⁸⁵⁾ mit den Kurven einiger anderer wirksamen und unwirksamen Aminochinolins. Aus seinen Ergebnissen, verbunden mit den Befunden von W.-R. Hölzel⁵⁵⁾, folgerte er: "Basisch alkylierte 6-Aminochinolins zeigen immer dann Malariawirksamkeit, wenn sowohl die Bildung einer 5,6-o-chinoiden als auch einer 5,8-p-chinoiden Struktur möglich ist, sofern die 7-Stellung nicht substituiert ist; ist die Ausbildung einer 5,8-p-chinoiden Struktur verhindert, so bedeutet das Unwirksamkeit, auch wenn sich eine 5,6-o-chinoide Struktur ausbilden könnte; ein steiles Absinken des Blutspiegels ist an die Bildung eines o-Chinons geknüpft".

Die Arbeitsgruppe um T.H. Porter und K. Folkers^{90a,b, 88)} konnte zeigen, daß 6-Alkylamino-5,8-chinolindione in vitro die NADH-Oxidase und Succinat-Oxidase aus Rinderherz-Mitochondrien hemmen und damit als Inhibitoren von Coenzym Q wirken. Die Hemmung konnte durch Zugabe von Coenzym Q₁₀ vollständig aufgehoben werden; es liegt also eine kompetitive Hemmung vor. Einige dieser Verbindungen erwiesen sich auch als aktiv gegen P. berghei in der Maus, so diejenigen mit einer Phenyläthylamino-, einer Cycloheptylamino- und einer Cyclooctyl-

amino-Seitenkette. In einer großen Anzahl von Veröffentlichungen berichten sie u. a. über 6-Alkyl-7-hydroxy-5.8-chinolindione^{90a, 110)}, 2-Alkyl-amino-1.4-naphthochinone⁸⁹⁾, 7-Alkylmercapto-6-hydroxy-5.8-chinolindione⁸⁷⁾ und 3-Alkylmercapto-2-hydroxy-1.4-naphthochinone⁸⁷⁾ als potentielle Antimetaboliten des Coenzym Q und als Malariamittel. Dies ist umso bemerkenswerter, als in tier- und menschenpathogenen Malariaerregern Coenzym Q₈ als dominierendes Ubichinon nachgewiesen werden konnte^{112, 100, 111)}. Als aktiv bei in vivo-Untersuchungen gegen *P. berghei* und *P. gallinaceum* erwiesen sich insbesondere die lipophilen Verbindungen, wie die Alkylmercapto-chinone. Von einer Reihe von 6-Alkylamino-2-methyl-5.8-chinolindionen¹²⁵⁾, zu denen auch der als wirksam vermutete Metabolit des B 505 (siehe Abb. 1) zu rechnen ist, war nur 6-Cycloheptylamino-2-methyl-5.8-chinolindion gegen Blutschizonten von *P. berghei* in der Maus als aktiv anzusehen, während sich basisch alkylierte 6-Amino-2-methyl-5.8-chinolindione entweder als wirkungslos oder wirksam, jedoch als toxisch erwiesen. Ebenfalls als aktiv, aber gleichzeitig toxisch, zeigten sich bei C. Temple Jr. und Mitarb. 2.4-Dimethyl-5.8-chinolindion und sein 6-Diäthylamino-äthylamino-Derivat^{118a)}, das dem vermuteten Metabolit des Ni 147/36 analog ist. Die gleiche Arbeitsgruppe stellte auch dem Amodiaquine analoge Verbindungen der 6-Amino-5.8-dimethoxy-2.4-dimethyl-chinoline^{118b)} dar und ebenso entsprechende 5.8-Chinolindione, die sich im in vivo-Test als unwirksam gegen *P. berghei* erwiesen.

1. 2. 3. Basisch alkylierte Aminochinoline mit tertiärer Aminogruppe

Im Hinblick auf die Schönhöfer'sche Chinon-Hypothese sollten Acylierung und Alkylierung der sekundären 4-, 6- oder 8-Aminogruppe in basisch alkylierten 4-, 6- oder 8-Aminochinolinen die Bildung von p- oder o-chinoiden Strukturen verhindern und somit eine Malaria-wirksamkeit vernichten.

Zur Unterstreichung dieser Ansicht stellte H. Andersag¹⁰¹⁾ ein acetyliertes 8-Aminochinolin und H. Maus s¹⁰¹⁾ Formyl- Atebrin her, die beide wirkungslos waren. Das in der 8-Aminogruppe acetylierte Plasmochin^(R) (SN 12448) ist bei F.Y. Wiselogle¹²⁹⁾ mit nur geringer Wirksamkeit beschrieben.

In der 6-Aminochinolin-Reihe erhielt H.-R. Seidel¹⁰⁷⁾ durch Acetylierung von Ni 147/36 das unwirksame 6-N-Acetylprodukt.

Nach K.-G. Liss on⁶⁸⁾ sind an der 4-Aminogruppe acetylierte, basisch alkylierte 4-Aminochinoline nicht bekannt; es gelang ihm auch nicht, Resochin^(R) (siehe Abb. 1) zu acetylieren.

Ein Beispiel für ein 8-Aminochinolin mit tertiär alkylierter Aminogruppe findet sich bei F.Y. Wiselogle¹²⁹⁾ mit 8-(Bis(3-aminopropyl)-amino)-6-methoxy-chinolin (SN 5691). Es zeigt keine Aktivität.

Bei H.-R. Seidel¹⁰⁷⁾ und K.-G. Liss on⁶⁸⁾ sind am 6-Aminostickstoff äthylierte Verbindungen beschrieben, welche entgegen der Chinon-Hypothese Malariawirksamkeit zeigten. Dagegen erwies sich ein von C. Temple Jr. und Mitarb.^{118b)} synthetisiertes, am 6-Aminostickstoff methyliertes Amodiaquine-Analoges von 6-Amino-5,8-dimethoxy-2,4-dimethylchinolin als unwirksam.

Die von K.-G. Liss on⁶⁸⁾ erhaltenen 4-Aminochinoline mit tertiärer 4-Aminogruppe erwiesen sich als aktiv, wobei das N-Methyl-derivat der 4-Aminogruppe des Resochins^(R) gegen P. vinckei etwa gleich wirksam war⁴³⁾.

1.2.4. 8- und 6-Aminochinoline mit substituierter 7-Stellung

Es war für die Schönhöfer'sche Chinon-Hypothese eine schöne Bestätigung, als von ihm, durch Einführung einer zusätzlichen Methoxygruppe in die 5-Stellung des Plasmochins^(R), eine Verbindung gefunden wurde, die eine bessere gametocide Wirksamkeit als Plasmochin^(R) selbst zeigte¹⁰¹⁾. Eine zusätzliche Substitution durch eine weitere Meth-

oxygruppe in 7-Stellung lieferte eine Verbindung, die völlig unwirksam war, obwohl theoretisch die Ausbildung von chinoiden Strukturen denkbar wäre. Schönhöfer erklärte diesen experimentellen Befund mit dem Begriff "Substitutionsprinzip". Er schrieb die Unwirksamkeit der 5,6,7-Trimethoxy-Verbindung der Anwesenheit des Substituenten in der 7-Stellung zu und konnte diese These von wirkungslosen 5,7-Dimethoxy- und 7-Methoxy-8-aminochinolin stützen¹⁰¹⁾.

Die Forderung für eine Malariawirksamkeit bei den 8-Aminochinolinen, eine freie 7-Stellung, scheint auch bei den 6-Aminochinolinen zuzutreffen, denn die von H. B a r n i c k e l⁸⁾ und H. P a u l u s⁸⁵⁾ hergestellten 7-Chlor bzw. 7-Bromderivate erwiesen sich als wirkungslos, aber toxisch. Ob dies auch, analog F. Schönhöfer, für ein 7-Methoxy-6-amino-chinolin gilt, konnte noch nicht gezeigt werden.

1.3. Zielsetzung der Untersuchungen

In Fortsetzung der Arbeiten am hiesigen Institut war das Ziel meiner Untersuchungen, weitere Hinweise für die Richtigkeit der Schönhöfer'schen Chinon-Hypothese zu finden. Insbesondere sollte der von E. F. E l s l a g e r⁴⁰⁾ und P. N i c k e l⁷⁹⁾ als wirksam postulierte Metabolit, das basisch alkylierte 6-Amino-5,8-chinolindion mit Hilfe der Gaschromatographie aus biologischem Material nachgewiesen werden. Die noch ausstehende Frage, ob die von E. S. J o s e p h s o n und Mitarb. 60, 61, 50) in der 8-Aminochinolin-Reihe und von H. P a u l u s⁸⁵⁾ in der 6-Aminochinolin-Reihe im Urin von Hühnchen bzw. von Mäusen in in vivo und in vitro Versuchen gefundenen 5,6-Chinolindione tatsächlich durch aktive Stoffwechselvorgänge entstandene Metaboliten sind, sollte durch quantitative Bestimmungen beantwortet werden.

Durch eine angestrebte Synthese von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl-amino)-5,7,8-trimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin sollte gezeigt werden, ob ein 6-Aminochinolin mit einer 7-Methoxygruppe ebenfalls, wie die in

7-Stellung methoxylierten 8-Aminochinoline und die in 7-Stellung halogenierten 6-Aminochinoline, wirkungslos gegen Malaria ist.

Durch eine angestrebte Synthese von an der 8-Aminogruppe N-äthylisiertem Plasmochin^(R) sollte geprüft werden, ob ein solches 8-Aminochinolin mit tertiärer Aminogruppe ebenso, wie die analogen Verbindungen in der 4- und 6-Aminochinolin-Reihe, Malariawirksamkeit zeigt.

Die von H. -R. Seidel¹⁰⁷⁾ vermutete in vivo -N-Entäthylierung von 6-N-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-N-äthylamino-5.8-dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin zu wirksamen Ni 147/36 sollte bewiesen werden.

1.4. Ergebnisse der Untersuchungen

Um die Eigenschaften und damit das chemische und physikalische Verhalten der als Metaboliten gesuchten Chinolindione kennenzulernen, wurden sie und ihre eventuell analytisch verwertbaren Phenazinderivate zunächst synthetisiert (Kapitel B 1).

- 1.4.1. In vivo- und in vitro-Aktivität einiger 5.6-, 5.8- und 7.8-Chinolindione, 2.3-Dichlor-1.4-naphthochinon, Primaquine und Ni 147/36 gegen P. vinckeii in der Maus.

Die in Tabelle 1 bzw. Abb. 2 aufgeführten Chinone, Ni 147/36 (1a) und Primaquine^(R) wurden von Herrn Univ.-Doz. Dr. Dr. E. F i n k am hiesigen Institut in vivo und in vitro gegen P. vinckeii an der Maus geprüft. Für die Überlassung seiner Ergebnisse möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich:

- 1) Die nicht basisch alkylierten 5.6-, 5.8- und 7.8-Chinolindione und das 2.3-Dichlor-1.4-naphthochinon^{24, 135)} sind in vitro deutlich aktiver als die beiden basisch alkylierten Chinolindione 3a und 7.
- 2) In vitro sind die Chinonderivate wesentlich aktiver als in vivo. Das könnte auf ungünstige Resorptions- und Verteilungsverhältnisse und auf eine mögliche Eiweißbindung (Reaktion mit SH- und NH₂-Gruppen) zurückzuführen sein.
Eine Ausnahme bildet das basisch alkylierte 5.6-Chinolindion 7 des Plasmochins^(R), welches eine gute in vivo-Wirksamkeit zeigt.
- 3) Die stärkste in vitro-Wirkung zeigt neben dem 2.3-Dichlor-1.4-naphthochinon das 5.8-Chinolindion 6^{92a)} mit 0,003 mg/kg.
Dieses Chinolindion wurde meines Wissens noch nicht als wirksamer Metabolit der 8-Aminochinoline in Betracht gezogen.

Tabelle 1 : In vivo- und in vitro- Aktivitäten

Ver- bindung	in vivo (i. p.)		in vitro	Q
	DMT mg/kg	DME	DME mg/kg	
I = 2	30	30	0.03	1000
II = 3a	100	100	1	100
III = 6	30	30	0.003	10000
IV = 7	30	1	0.3	3.3
V = 15	100	100	0.01	10000
VI = 25	100	100	0.01	10000
VII	100	100	0.01	10000
VIII	30	30	0.003	10000
Ni 147/36 = 1a	45 (LD ₅₀)	0.5	1	0.5
Primaquine	60 (LD ₅₀)	0.4	0.3	1.3

DMT = maximal tolerierte Dosis

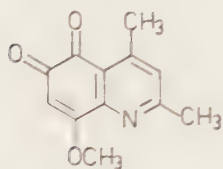
DME = minimal effektive Dosis

LD₅₀ = letale Dosis für 50 % der Tiere

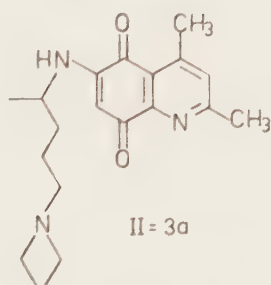
Q = $\frac{\text{DME (in vivo)}}{\text{DME (in vitro)}}$

Die Dosierung mg/kg bei den in vitro-Versuchen entspricht dem Gehalt in mg/10 ml Inkubationsmedium, von welchem 0,2 ml pro 20 g Maus i. p. injiziert wurden.

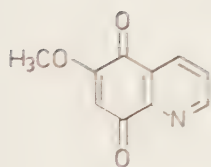
Abb. 2 : In vivo und in vitro gegen *P. vinckei* geprüfte Chinone



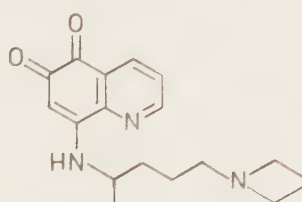
I=2



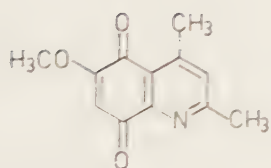
II=3a



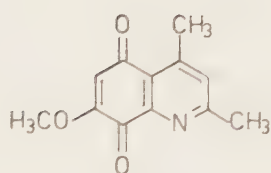
III=6



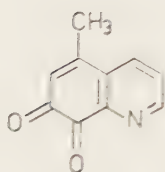
IV=7



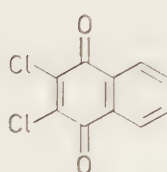
V=15



VI=25



VII



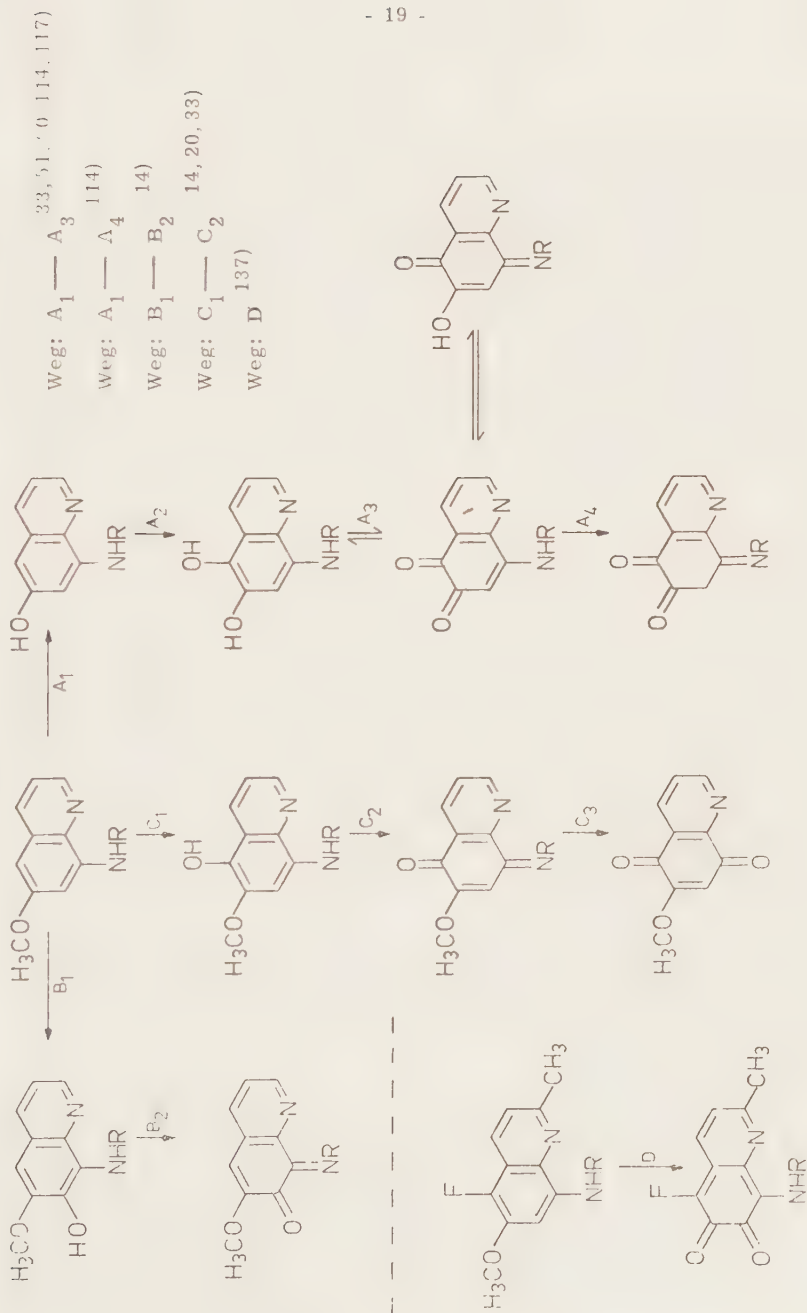
VIII

- 4) Die parallel geprüften 6- und 8-Aminochinoline, Ni 147/36 und Primaquine^(R), zeigen in vitro ebenfalls Wirksamkeit. Dies ist wohl zum Teil auf die Versuchsanordnung zurückzuführen, bei der den Versuchstieren mit der Inkubationslösung auch noch intaktes Aminochinolin injiziert wird. Es könnte während der Inkubation jedoch schon eine teilweise oxidative Umwandlung zu den Chinolindionen stattfinden.
- 5) Die untersuchten Chinolindione erwiesen sich vergleichbar toxisch. Die therapeutischen Indices liegen um 1. Auch hier bildet das Chinolindion 7 eine Ausnahme, mit dem TI-Wert 30.

1.4.2. Erweitertes Metabolisierungsschema der 8-Amino-6-methoxychinoline

Das von W.-R. Hölzel⁵⁵⁾ angegebene Übersichtsschema der diskutierten malariawirksamen Metaboliten basisch alkylierter 8-Amino-6-methoxychinoline muß auf Grund der überragenden in vitro-Wirksamkeit des 6-Methoxy-5,8-chinolindions (6) erweitert werden. (s. Schema, C₃). Die Bildung von 6 setzt, entgegen den Befunden von C.C. Smith¹¹⁴⁾ und A.R. Tarlov¹¹⁷⁾, voraus, daß eine Hydroxylierung in 5-Stellung auch vor der Demethylierung der 6-Methoxygruppe stattfindet. Nach den experimentellen Ergebnissen von Y. Ullrich¹²⁴ ist dies wahrscheinlich. Er erhielt bei der Inkubation von Anisol mit Rattenlebermikrosomen eine Produktverteilung (% relative Ausbeute) von Phenol : 2-Hydroxyanisol : 4-Hydroxyanisol wie 60:7:33 . Demzufolge ist die O-Desalkylierung zwar vorherrschend, jedoch tritt daneben auch eine primäre Monooxygenierung durch mikrosomales Cytochrom P 450 auf.

Abb. 3 : Erweitertes Metabolisierungsschema basischer alkylierter 3-Amino-6-methoxy-chinoline



1.4.3. Extraktionsbedingungen für die Chinolindione

Zur Bestimmung des Extraktionsverhaltens der Chinolindione 2, 6, 3a und 7 wurde die Verteilung zwischen wäßriger und organischer Phase in Abhängigkeit vom pH-Wert bestimmt. Da nach H. P a u l u s⁸⁵⁾ das Chinolindion 2 sich in Chloroform und Toluol gut löst, schlecht dagegen in Hexan und Äther, wurden als organische Phasen Chloroform und Benzol gewählt; als wäßrige Phase dienten Citrat-, Phosphat- und Boratpuffer von pH 2-9. In Abb. 4 ist die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten $K =$

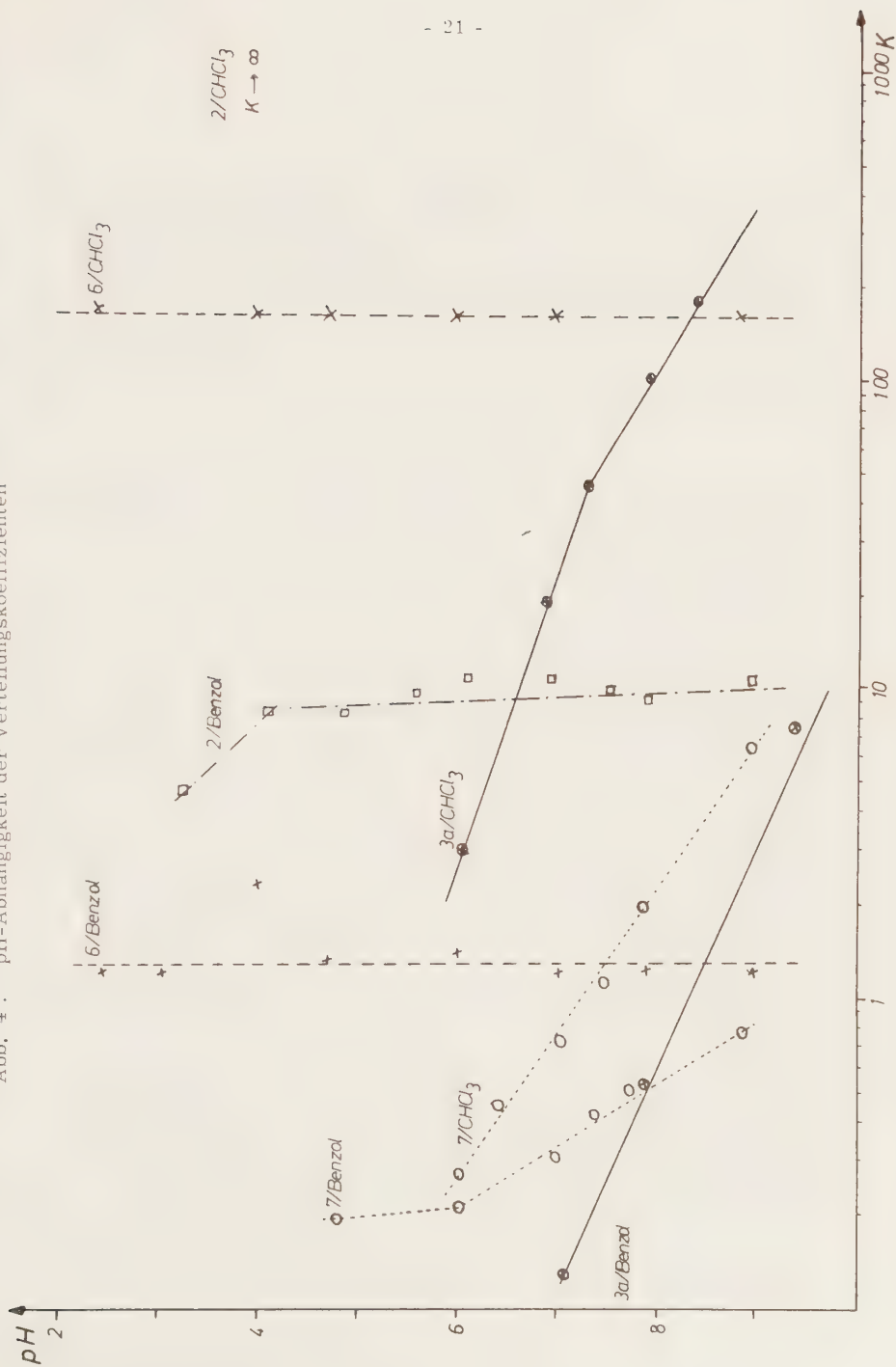
$$\frac{c(\text{organ. Phase})}{c(\text{H}_2\text{O})} \text{ vom pH-Wert graphisch dargestellt.}$$

Bei den nicht basisch alkylierten Chinolindionen 2 und 6 ist der Verteilungskoeffizient vom pH-Wert unabhängig, d.h. diese Verbindungen zeigen im wäßrigen Milieu am Chinolinringstoff keinen, oder nur einen äußerst schwachen basischen Charakter. Sie sind aus saurer Lösung mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar und so von den basisch alkylierten Chinolindionen und von unverändertem Aminochinolin abtrennbar. Nach Abb. 4 gelingt es, mit Chloroform durch ein einmaliges Ausschütteln die Chinolindione 2 und 6 um pH 5 praktisch quantitativ in die organ. Phase zu überführen.

Die basisch alkylierten Chinolindione 3a und 7 sind am tertiären Stickstoff der Diäthylaminogruppe der Seitenkette protonierbar und somit unterhalb pH 7 nur schlecht extrahierbar. Nach Abb. 4 gelingt eine quantitative Ausschüttelung mit Chloroform im pH-Bereich von 9 durch mehrmaliges Extrahieren.

Als Lösungsmittel zur Extraktion der Chinolindione wurde, dem Verteilungsverhalten dieser Substanzen zufolge, Chloroform gewählt. Mit einem solchen polaren Lösungsmittel erhält man aus biologischem Material neben den Metaboliten eine Reihe von Fremdstoffen, die bei einer nachfolgenden gas-chromatographischen Untersuchung der Extrakte erheblich stören. Dies trifft besonders für die nicht basisch alkylierten Chinolin-

Abb. 4: pH-Abhängigkeit der Verteilungskoeffizienten



dione mit ihren kurzen Retentionszeiten zu. Um trotzdem die guten Extraktionseigenschaften des Chloroforms ausnutzen zu können, wurden die Extrakte vor der Gaschromatographie mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die betreffenden, durch Vergleich ermittelten Zonen, nach Extraktion, einer gas-chromatographischen Untersuchung unterworfen.

1.4.4. Gas-chromatographische Bestimmung der 5.6-Chinolindione 2 und 7 als Metaboliten von Ni 147/36 und Plasmochin^(R) im Urin der Maus.

(s. Kap. B. 2.1.5. ff)

1.4.4.1. Wahl der Methode

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Chinonen wurde die Gas-Chromatographie bisher nur vereinzelt eingesetzt. Die beschriebenen Verfahren wenden vor allem die Papier-^{63b, 16)} und Dünnschichtchromatographie^{7a, 34a, 96a)} an.

Eine säulenchromatographische Trennung von natürlichen Chinonen und α -Tocopherolen mit anschließender Messung der UV-Absorption ist bei J.P. Williams^{126a)} beschrieben. Eine Trennung von natürlich vorkommenden Anthrachinonderivaten auf Kieselgel-Säulen mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie geben P.P. Rai und T.D. Turner^{93a)} an.

Gas-chromatographische Untersuchungen an Benzochinonderivaten wurden von R.D. Chambers und Mitarb.²⁵⁾ durchgeführt, an Hydroxyanthrachinonen nach Silylierung von T. Furuya und Mitarb.⁴⁵⁾.

Die gas-chromatographische Bestimmung von 2-Methyl-1.4-naphthochinon (Menadion) und seiner Additionsverbindung an Natriumhydrogensulfit, unter Verwendung von OV-17-Säulen und des Flammenionisationsdetektors, wurde von D.A. Libby, A.J. Sheppard, A.R.

Prosser^{67, 66, 109)} und von V. W. Winkler¹²⁸⁾ entwickelt und gehört heute zu den offiziellen Analysenmethoden der A. O. A. C.^{84a)}. Im Rahmen seiner Arbeit beschreibt H. Paulus⁸⁵⁾ die Gas-chromatographierbarkeit von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) und seines Phenazinderivates 4a über eine OV-1-Säule unter Verwendung eines stickstoffselektiven Detektors.

Es erschien daher angebracht, diese Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der gesuchten Chinolindione einzusetzen.

1.4.4.2. Gas-Chromatographie

1.4.4.2.1. Der stickstoffselektive Detektor (NsFID)

Bei dem zur Verfügung stehenden stickstoffselektiven Detektor ist die Platin-Kollektorelektrode mit einem Rubidiumbromid-Einkristall ausgestattet. Durch Absenken des Kristalls in die Flammenzone wird das Ionisationsmaximum, hervorgerufen durch maximale Emission und Ionisation von Rubidiumatomen, aufgesucht. Durch geringfügige Änderung des Abstandes der Salzoberfläche zur Brennerdüse wird dann die Stellung einjustiert, die der optimalen Stickstoffsensitivität und -selektivität, d.h. dem Anzeigeverhältnis C/N entspricht. Da Empfindlichkeit und Selektivität auch von der Detektortemperatur und von den Gasflußraten der Brenngase und des Trägergases beeinflußt werden, muß die optimale Stellung des Kristalls zur Flamme bei einem "Stickstoff-Detektor" dieser Bauweise vor jeder Analysenserie neu gefunden werden.

Der NsFID detektiert linear und proportional dem Stickstoffgehalt organischer Moleküle, unabhängig von der Molekülstruktur und dem Oxidationszustand des Stickstoffes. M. Donike und Mitarb.^{32a)} geben für eine Reihe von stickstoffhaltigen Pharmaka einen Linearbereich von 20 pg - 200 ng/Injektion für diesen Detektor an.

1.4.4.2.2. Chromatographiesäulen

Als universelle Trennsäule für die nicht basisch alkylierten Chinolindione und für die Pyrido [3,2-a]phenazine 4a und 8 eignete sich eine 2 m Glassäule, 2,5 % OV-17 auf Chromosorb W (AW-DMCS) H.P., 80-100 mesh.

1.4.4.2.3. GC der nicht basisch alkylierten Chinolindione

Da die Arbeitstemperatur bei der gas-chromatographischen Bestimmung dieser Chinolindione über ihrer Zersetzungstemperatur lag, wurde zunächst angenommen, daß nicht die intakten Chinone, sondern thermische Zersetzungsprodukte in den Detektor gelangten. Die nahezu gleiche Retentionszeit der beiden isomeren Chinolindione 2 und 15 ließ auf ein identisches Zersetzungsprodukt schließen. Eine unter gleichen Bedingungen durchgeführte Analyse mit Hilfe der GC-MS-Kopplung zeigte jedoch, daß die untersuchten Chinolindione die gas-chromatographische Trennung bei den gewählten hohen Temperaturen unzersetzt überstehen ^{x)}.

Die halbquantitative Bestimmung von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) als Metabolit von Ni 147/36 (1a) nach i.p. Gabe von 20 mg/kg 1a im Urin der Maus und nach Inkubation von 1a mit Urin erfolgte nach zwei unterschiedlichen Methoden: a) durch direkte GC von dünnschichtchromatographisch gereinigten Chloroformextrakten, und b) durch GC nach Derivatisierung von 2 mit o-Phenylendiamin zu 4a.

a) Eine direkte Analyse des rohen Chloroformextraktes des Urins war nicht möglich, da das Chinolindion 2, wie auch die übrigen beschriebenen nicht basisch alkylierten Chinolindione, unter den gewählten GC-Bedingungen eine sehr kurze Retentionszeit hat (s. Kap. B. 2.1.5.7.1.)

x) Ich danke Herrn Prof. Dr. P. Nickel, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, für die Ermöglichung dieser Analyse.

Daher wurde eine DC-Auftrennung der Rohextrakte auf Kieselgel-Fertigplatte mit Fluoreszenzindikator vorgeschaltet. Nach Betrachten unter UV-Licht wurden die betreffenden Zonen abgehoben, extrahiert, und dieser Extrakt einer gas-chromatographischen Untersuchung unterworfen. Durch gleichzeitiges Mitlaufenlassen eines inneren Standards und mehrerer Vergleiche wurden Fehler, die bei einem solchen Verfahren auftreten, möglichst klein gehalten.

b) Die Umsetzung von 2 mit o-Phenylendiamin zum gas-chromatographierbaren Phenazinderivat 4a ist beschrieben^{85, 54)}. 4a weist den Vorteil eines größeren Stickstoffgehaltes für die Detektion mit dem stickstoffselektiven Detektor auf. Durch die längere Verweildauer von 4a auf der Trennsäule war auch eine direkte Bestimmung aus dem Rohextrakt möglich.

Wie im chemisch-theoretischen Teil beschrieben, bildet sich bei der Umsetzung von 2 mit o-Phenylendiamin in Eisessig im präparativen Maßstab u. a. leicht isolierbares 5-(2-Amino-anilino)-1,3-dimethyl-pyrido[3,2-a]phenazin (4b), weshalb bei der Synthese von 5-Methoxy-1,3-dimethyl-pyrido[3,2-a]phenazin (4a) auf absol. Äthanol als Lösungsmittel übergegangen wurde.

Für den analytischen Nachweis des o-Chinons 2 als Phenazinderivat 4a kam es jedoch auf eine möglichst quantitative Umsetzung zu 4a an. Daher wurde die Umsetzungsrate $2 \rightarrow 4a$ in verschiedenen Lösungsmitteln gas-chromatographisch bestimmt (Tabelle 2).

Tabelle 2 : Umsetzungsrate 2 $\longrightarrow$ 4a in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	2 [μ g]	4a [μ g]	Umsetzungsrate [%]
Äthanol, absol.	50	11.3	17
Methanol, absol.	50	6.5	9.8
Methylenchlorid	50	8.5	12.8
Eisessig	50	20.1	30.2

Da die Umsetzungsrate in Eisessig bei weitem am höchsten war, wurden die Derivatisierung der eingedampften Urinextrakte in diesem Lösungsmedium durchgeführt. Um auch die bei diesem Verfahren leicht auftretenden Fehler gering zu halten, wurde ein innerer Standard benutzt und gleichzeitig Vergleichsanalysen, Zugabe von definierten Mengen von 2 zu Leerurin, durchgeführt.

1.4.4.2.4. GC der basisch alkylierten Chinolindione

Die basisch alkylierten Chinolindione 3a und 7 konnten direkt nicht gaschromatographiert werden. Die Ursache liegt wohl in den niedrigen Zersetzungstemperaturen dieser Verbindungen; das p-Chinon 3a zersetzt sich unter Schwarzfärbung bei ca. 100^oC, ohne definierte chromatographierbare Derivate zu bilden.

Derivatisierungsversuche von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2.4-dimethyl-5.8-chinolindion (3a) durch Silylierung oder durch Reduktion und anschließende Acetylierung erbrachten keine einheitlichen gaschromatographierbaren Produkte; ebenso die, aus der Steroid-Analytik bekannte Umsetzung mit o-Methylhydroxyl-ammoniumchlorid. Der Nachweis von 3a erfolgte daher dünnschichtchromatographisch.

Das 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-chinolindion (7) konnte dagegen nach der bekannten Derivatisierung mit o-Phenylendiamin in Eisessig zum Phenazinderivat 8 gas-chromatographisch untersucht werden. Vor Durchführung der GC wurde auch hier eine DC-Auftrennung des Rohextraktes vorgeschaltet. Ein innerer Standard für 8 mit vergleichbaren Eigenschaften konnte dagegen nicht gefunden werden, so daß die quantitativen Werte der in vivo- und in vitro-Bildung von 7 aus Plasmochin^(R) durch eine gleichzeitige Analyse einer Verdünnungsreihe von 8 grob abgeschätzt wurden.

1.4.4.2.5. Innere Standards

Für die Bestimmung des 5,6-Chinolindions 2 bot sich als innerer Standard 6-Methoxy-5,8-chinolindion (6) an. Es entspricht den Anforderungen, der an einen inneren Standard zu richten ist¹²⁷⁾: Stabilität unter den gegebenen analytischen Bedingungen; ein möglichst ähnlicher Retentionswert wie die zu bestimmende Substanz, jedoch noch eine vollständige Basislinientrennung; Übereinstimmung seiner funktionellen Gruppen mit denjenigen der Analysensubstanz. Die Forderung des möglichst ähnlichen Retentionswertes erfüllte dieser innere Standard sowohl in der GC, als auch in der vorgeschalteten DC auf Kieselgelplatten mit dem Fließmittel Chloroform/Methanol (9+1) (hR_F für 2 = 66; für 6 = 59), so daß ein gemeinsames Abheben von Analysensubstanz und Standard von der Dünnschichtplatte möglich war.

Für die Bestimmung des 5,6-Chinolindions 2 als Phenazinderivat 4a wurde das literaturbekannte 1,5-Dimethyl-pyrido[3,2-a]phenazin^{119b)} gewählt, welches oben genannte Forderungen ebenfalls erfüllen konnte.

Bei der Verwendung eines inneren Standards muß die unterschiedliche Anzeigeempfindlichkeit des Detektors für Analysensubstanz und Standard^{63, 63a)} und ebenso ihr unterschiedliches Extraktionsverhalten berücksichtigt werden⁸⁵⁾. Zur quantitativen Berechnung der Analysen wurden daher parallel

zum jeweiligen Hauptversuch, wie in Kap. B. 2.1.5.7.2. beschrieben, Korrekturfaktoren bestimmt.

1.4.4.3. Ergebnisse

Im Urin von je 5 Mäusen, die mit 20 mg/kg Ni 147/36 (1a) bzw. 10 mg/kg Plasmochin^(R) (16) i.p. behandelt worden waren, wurde der Gehalt an 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5.6-chinolindion (2) direkt (a) und nach Derivatisierung zu 4a (b) bzw. der Gehalt an 8-(4-Diäthylamino-1-methylbutylamino)-5.6-chinolindion (7) bestimmt. Als Vergleichsanalysen wurden jeweils etwa gleiche Mengen an Injektionslösungen von 1a und 16 in je 1 ml 2proz. Schwefelsäure in den Harnauffanggefäßen von Stoffwechselkäfigen vorgelegt. Man ließ für die Dauer des Hauptversuchs den Urin von je 5 unbehandelten Mäusen zutropfen und bestimmte anschließend die Bildungsrate der 5.6-Chinolindione 2 und 7 in vitro.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3 : Bildungsrate von 5.6-Chinolindionen im Harn der Maus in vivo und in vitro

Versuch	Dauer	gegeben [mg] Amino- chinolin	gefunden [mg] 5.6-Chinolindion 2 bzw. 7	Bildungs- rate [%]
a) in vivo Ni 147/36 in vitro	13 h	2.26	$2.1 \cdot 10^{-3}$	0.16
		2.00	$26.4 \cdot 10^{-3}$	2.3
b) in vivo Ni 147/36 in vitro	24 h	2.42	$11 \cdot 10^{-3}$	0.8
		2.42	$66 \cdot 10^{-3}$	4.8
in vivo Plasmochin ^(R) in vitro	13 h	1.05	$0.6 - 1.3 \cdot 10^{-3}$	0.06 - 0.13
		1.00	$13-20 \cdot 10^{-3}$	1.3 - 2

Aus den Werten ist zu ersehen, daß die Bildungsrate *in vitro* höher erscheint als *in vivo*.

Das könnte auf eine Bindung von *in vivo* gebildetem reaktivem Chinolindion an Eiweißstrukturen zurückzuführen sein. Wesentlich trägt aber die später beschriebene unspezifische Autoxidation der basisch alkylierten Aminochinoline an der Luft in den *in vitro* -Ansätzen dazu bei.

1.4.5. In vivo N-Entäthylierung von basisch alkylierten 6-Aminochinolininen mit tertiärer 6-Aminogruppe in der Maus
(s. Kap. B. 2.2.3.)

Als Modellsubstanz für eine solche Metabolisierung wurde das von H. -R. Seidel¹⁰⁷⁾ dargestellte 6-N-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl)-N-äthylamino-5.8-dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (1b) herangezogen, daß sich gegen Malaria in der Maus als wirksam erwiesen hatte. H. -R. Seidel¹⁰⁷⁾ vermutete eine N-Entäthylierung *in vivo* zu Ni 147/36 (1a).

Im Urin von mit 1b i.p. behandelten Mäusen konnte das N-entäthylierte 1a als Hauptmetabolit dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen werden.

Die Malariawirksamkeit der basisch alkylierten 6-Aminochinoline mit äthylierter 6-Aminogruppe dürfte u.a. auf diese *in vivo* N-Entäthylierung zurückzuführen sein.

Wie in Kap. B. 2.2.2. beschrieben, wurde auch die *in vivo*- Bildung von 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) nach i.p. - Gabe von 1b in der Maus, und die *in vitro*- Bildung im Mäuseurin untersucht.

Auch hier konnte das Chinolindion 2 als Phenazinderivat gas-chromatographisch sowohl im *in vivo*-Versuch als auch im *in vitro*-Ansatz qualitativ nachgewiesen werden.

1.4.6. Inkubation basisch alkylierter 6- und 8-Aminochinoline
mit Gewebeschnitten der Mäuseleber
(s. Kap. B. 2.3.)

1.4.6.1. Wahl der Methode

Biologische O-Dealkylierungen, Abspaltung einer Alkylgruppe aus einer Alkoxygruppierung unter Bildung von pharmakologisch aktiven phenolischen Verbindungen, sind literaturbekannt; so z.B. die Demethylierung von Codein zu Morphin^{1,6)} oder die Abspaltung der Äthylgruppe von p-Äthoxyacetanilid (Phenacetin) zu p-Acetyl-amino-phenol¹⁹⁾. Das Enzymsystem für solche O-Dealkylierungen ist, wie die Enzymsysteme für N-Dealkylierungen und für Ringhydroxylierungen^{77b, 73)}, in den Mikrosomen der Leber lokalisiert und benötigt reduziertes NADP und Sauerstoff^{6,48)}. Durch Gabe einiger Pharmaka, z.B. Phenobarbital, läßt sich dieses Enzymsystem aktivieren^{77b)}.

O-Demethylierungen gehen unter Aufnahme von Sauerstoff, Bildung einer Hydroxymethylgruppe und Abspaltung von Formaldehyd vor sich⁹⁴⁾ und können in vitro mit isolierten Lebermikrosomen, aber auch mit Gewebeschnitten der Leber^{1, 77a)} demonstriert werden.

Es erschien aussichtsreich, durch Inkubation von Leberschnitten der Maus in Inkubationslösungen, die das basisch alkylierte 6-Amino-5.8-dimethoxy-chinolin 1a bzw. das 8-Amino-6-methoxy-chinolin 16 enthielten, entsprechende phenolische Verbindungen und, da Sauerstoffatmosphäre vorhanden ist, die erwarteten Chinonmetaboliten zu erhalten.

1.4.6.2. Darstellung und Prüfung der Leberschnitte

Die Darstellung der Leberschnitte gelang mit guten Ergebnissen nach der Methode von W. D e u t s c h³²⁾. Die Überprüfung der O-Demethylierungsfähigkeit erfolgte mit o- und p-Nitroanisol nach K.J.

Netter^{77a)} durch DC-Nachweis der Demethylierungsprodukte in einem basischen Fließmittel, in welchem sich Nitrophenole gelb anfärben.

1.4.6.3. Durchführung

Die Inkubationsansätze wurden in Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung, die 2 mg/% Glucose enthielt, und der soviel Ni 147/36 (1a) bzw. Plasmochin^(R) (16) als Naphthalindisulfonate zugefügt worden war, daß 10^{-3} molare Lösungen entstanden, über 2 Stunden bei 38°C und unter Durchperlen von wassergesättigtem Sauerstoff durchgeführt. Als Vergleichsanalysen wurden ein Inkubationsansatz mit Leberschnitten ohne Zusatz von Aminochinolin (s. Abb. 5, DC II : C) und je ein Inkubationsansatz ohne Leberschnitte, doch mit zugesetztem Aminochinolin (s. Abb. 5, DC I : Bs, DC II : Ba, DC III : II und IV) durchgeführt. Der Extrakt des Inkubationsansatzes mit Plasmochin^(R) (16) wurde einmal direkt und einmal nach Umsetzung mit o-Phenylendiamin zum Phenazinderivat dünnschichtchromatographisch untersucht. DC, GC und UV-spektroskopische Untersuchungen erfolgten nach Kapitel B. 2.1.4.

1.4.6.4. Ergebnisse

a) Prüfung der O-Demethylierungsfähigkeit

Bei der Überprüfung der O-Demethylierungsfähigkeit der Leberschnitte wurde p-Nitroanisol entmethyliert, nicht aber o-Nitroanisol. Der Grund dafür könnte darin zu suchen sein, daß verschiedene Rassen und Arten Unterschiede in der mikrosomalen Oxidation zeigen¹⁰⁸⁾.

b) Inkubation von Ni 147/36 (1a) (s. Abb. 5, DC I und DC II)

Auffallend, besonders im DC II erkennbar, ist die starke Zersetzung von Ni 147/36 (1a). Vergleicht man die DC's der Extrakte des Inkuba-

tionsansatzes mit Leberschnitten (As u. Aa) und des Vergleichsansatzes ohne Leberschnitte (Bs u. Ba) so zeigen sie sich überraschenderweise als weitgehend identisch. In beiden Versuchsansätzen ist das o-Chinon 2 entstanden, was sich am identischen hR_F -Wert und an der Rotfärbung von 2 im Fließmittel Benzol/Diäthylamin (9+1) erkennen läßt. Das o-Chinon 2 läßt sich bei pH 5.5 in Gegenwart von Lebergewebe nicht mit Chloroform extrahieren (s. DC I). Alkalisiert man, so ist es extrahierbar (s. DC II). Das basisch alkylierte p-Chinon 3a, erkennbar an orangegefärbten Flecken, ist ebenfalls im Inkubations- und Vergleichsansatz entstanden.

Zur weiteren Sicherung des p-Chinons wurden die orangegefärbten Flecke der Bahnen Aa und Ba von der Platte abgekratzt, eluiert und ein UV-Spektrum vom Eluat aufgenommen. Es wies mit einem Vergleichsspektrum identische Maxima im Bereich von 240 und 279 nm auf. Vgl. Abb. 9.

c) Inkubation von Plasmochin^(R) (16)
(s. Abb. DC III)

Die oxidativen Zersetzungsprodukte des Plasmochin^(R) (16) sind nicht so zahlreich wie die des Ni 147/36 (1a) (s. DC III : III u. IV). Die zahlreichen Flecken auf den Bahnen I und II sind durch die Umsetzung des Extraktes mit o-Phenylendiamin entstanden. Wie bei 1a ist auch bei Plasmochin^(R) das Zersetzungsmuster des Inkubations- und Vergleichsansatzes weitgehend identisch. Das o-Chinon des Plasmochins^(R) ist als Phenazinderivat (8) als stark gelbgrün fluoreszierender Fleck in beiden Ansätzen deutlich zu sehen. Das p-Chinon 6 ist nach DC wahrscheinlich (DC III, III und IV).

Abb. 5 : Dünnschichtchromatogramme zu den Leberschnitt-Inkubationsansätzen

DC I

	1a	2	As	Bs	3a	
			 	 		

DC II

	1a	2	Aa	Ba	3a	C	
	 	 	    	    	 		

DC III

	16	I	8	II	6	III	IV	
	 	    	 	    	 	    	    	

d) Erläuterungen zu den Dünnschichtchromatogrammen

DC I : Fließmittel: Chlороform/Methanol (9+1),
DC-Fertigplatte Kieselgel 60 F-254, Merck

1a = Ni 147/36

2 = o-Chinon 2

As = bei pH 5.5 erhaltener Extrakt aus Inkubationsansatz

Bs = bei pH 5.5 erhaltener Extrakt aus Vergleichsansatz
ohne Leberschnitte

3a = p-Chinon 3a

DC II : Fließmittel: Benzol/Diäthylamin (9+1),
DC-Fertigplatte Kieselgel 60 F-254, Merck

1a = Ni 147/36

2 = o-Chinon 2

Aa = im Alkalischen erhaltener Extrakt aus Inkubationsansatz

Ba = im Alkalischen erhaltener Extrakt aus Vergleichsansatz
ohne Leberschnitte

3a = p-Chinon 3a

C = Extrakt aus Vergleichsansatz mit Leberschnitten
ohne Aminochinolinzusatz

DC III : Fließmittel: Benzol + Triäthylamin (9+1),
DC-Fertigplatte Kieselgel 60 F-254, Merck

16 = Plasmochin^(R)

I = im Alkalischen erhaltener Extrakt mit nachfolgender
Derivatisierung mit o-Phenylendiamin

8 = Phenazinderivat 8

II = im Alkalischen erhaltener Extrakt aus Vergleichsansatz
ohne Leberschnitte mit nachfolgender Derivatisierung
mit o-Phenylendiamin

6 = p-Chinon 6

III = im Alkalischen erhaltener Extrakt des Inkubationsansatzes

IV = im Alkalischen erhaltener Extrakt des Vergleichs-
ansatzes ohne Leberschnitte

1.4.7. Nachweis des p-Chinons in Mäuseleber nach i.p. Gabe
von Ni 147/36 (1a)

(s. Kap. B. 2.3.3)

Die Lebern von fünf, mit 20 mg/kg Ni 147/36 (1a) i.p. behandelten Mäusen wurden 2 Stunden nach der Applikation entnommen, sofort nach der Methode von W. Deutsch ³²⁾ geschnitten und bei pH > 10 mit Chloroform extrahiert (Abb. 6, DC I u. II, Bahn I).

Nach Abtrennen der Chloroformphase wurde der Rückstand (wäßrige Phase und Gewebe) mit konz. Salzsäure erhitzt und nach erneutem Alkalisieren nochmals mit Chloroform ausgeschüttelt (Abb. 6, DC I u. II, Bahn II). Von den Chloroformextrakten wurden in zwei verschiedenen Fließmittelsystemen Dünnschichtchromatogramme angefertigt.

1.4.7.1. Ergebnis

Das basisch alkylierte 5.8-Chinolindion 3a läßt sich anhand der orange gefärbten Flecken mit identischen hR_F -Werten in den, mit konz. Salzsäure behandelten Ansätzen eindeutig dem mitlaufenden Vergleich zuordnen (Abb. 6, DC I u. DC II, Bahn II).

Zur zusätzlichen Identifizierung wurden die Flecken der Bahnen II und 3a eluiert und vom Eluat UV-Absorptionsspektren aufgenommen. In der Lage der Maxima zeigten sich die Spektren identisch.

1.4.8. Autoxidation von basisch alkylierten 5-, 6- und 8-Amino-chinolinen und von 6-(2-Diäthylamino-äthoxy)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin durch Luftsauerstoff.

(s. Kap. B.2.4.)

1.4.8.1. Ausgangspunkt

Die Beobachtung, daß bei den Leberschnittinkubationsversuchen auch in den gewebefreien Vergleichsansätzen Chinolindione entstehen, bildete zunächst den Ausgangspunkt für die Autoxidationsversuche. Hinzu kamen noch die Beobachtungen von R. W. Berlin^{er} ¹¹⁾, daß sich eine mehrere Jahre alte Lösung von Plasmochin^(R) in vitro als hochaktiv erwies, und von U. Münch⁷⁵⁾, daß sauerstoffgesättigte Lösungen des 6-Aminochinolins B 505 bei Bestrahlung mit einer Leuchtstofflampe einen Verlust an B 505 aufwiesen, was oxidative Prozesse vermuten läßt.

1.4.8.2. Durchführung

Je 1 mg von Ni 147/36 (1a), Plasmochin^(R) (16), 5-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-6,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin ¹³¹⁾ (28) und 6-(2-Diäthylamino-äthoxy)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin ⁶²⁾ (79) wurden in je 5 ml Phosphatpuffer pH 5.0 (5.5) und pH 7.4 dreizehn Stunden offen im Dunkeln stehengelassen. Nach Extraktion mit Chloroform wurde auf Kieselgel-Dünnschichtplatten aufgetragen und entwickelt. Nach Identifikation durch mitlaufende Vergleichssubstanzen wurden die in Frage kommenden Flecke eluiert und gaschromatographisch bzw. spektroskopisch untersucht.

Bei diesen Versuchen wurde nur auf die Bildung von nicht basisch alkylierten 5,6- und 5,8-Chinolindionen geachtet, da nur diese gas-chromatographierbar sind.

1.4.8.3. Ergebnisse

a) Ni 147/36 (1a):

(s. Abb. 7, DC I)

Das o-Chinon 2 war in wäßriger Lösung sowohl bei pH 5 als auch bei pH 7 entstanden. Eine quantitative gas-chromatographische Überprüfung ergab, daß sich bei pH 7,4 etwa doppelt soviel gebildet hatte. Dieser Befund wurde inzwischen von P. Nickel^{x)} bestätigt. Orientierende polarographische Untersuchungen ergaben, daß Ni 147/36 (1a) nach Stehen über Nacht einer 10^{-4} molaren, wäßrigen Lösung von pH 7 zu etwa 1/3 zum o-Chinon 2 oxidiert wird und zu etwa 1/30 zum p-Chinon 3a.

b) Plasmochin^(R) (16):

(s. Abb. 7, DC II)

Plasmochin^(R) (16) wird in wäßriger Lösung zum p-Chinon 6 oxidiert. Die gas-chromatographische Untersuchung eines Extraktes der betreffenden Flecke untermauerte den DC-Befund, zeigte aber auch, daß nur sehr wenig p-Chinon 6 entsteht. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß dieses Chinolindion 6 von allen untersuchten, nicht basisch alkylierten Chinolindionen die labilste Verbindung darstellt. So konnte in einer 24 Stunden alten Lösung von 6 in Wasser gas-chromatographisch nur noch ein verschwindend kleiner Anteil von 6 nachgewiesen werden. Demzufolge könnte insgesamt autoxidativ eine größere Menge von 6 entstehen, jedoch während der 13 stündigen Dauer des Versuches wieder zersetzt werden.

c) 5-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-6,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (28):

(s. Abb. 7, DC III)

Das in der biologischen Prüfung sich als unwirksam erwiesene 5-Amino-chinolin 28¹³¹⁾ bildete bei der Autoxidation ebenfalls ein nicht basisch

x) P. Nickel, Persönliche Mitteilung.

alkyliertes Chinolindion. Ob es sich um das mögliche 6-Methoxy-2.4-dimethyl-5.8-chinolindion (15) oder um das von H. Paulus⁸⁵⁾ angegebene 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5.6-chinolindion (2) handelt, konnte durch dünnschicht- und gas-chromatographische Untersuchung nicht geklärt werden, da hR_F -Werte und Retentionszeiten in den verwendeten Systemen zu nahe beieinander liegen. Ein Vergleich der UV-Spektren von 2 und 15 sowie dem Extrakt des betreffenden Fleckes in Methanol weist auf das p-Chinon 15 hin.

d) 6-(2-Diäthylamino-äthoxy)-5.8-dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin⁶²⁾ (29):

Die ebenfalls unwirksame Verbindung 29, bei welcher eine basische Seitenkette über einen Äthersauerstoff in 6-Stellung an das Chinolinsystem gebunden ist, zeigt bei der Autoxidation keine Bildung des o-Chinons 2.

1.5. Zusammenfassung der Ergebnisse und Folgerung

Die vorstehenden Ergebnisse zeigen, daß gegen Malaria wirksame, basisch alkylierte 6-Amino-5.8-dimethoxy- und 8-Amino-6-methoxy-chinoline, der Forderung F. Schönhöfers entsprechend, leicht in Chinolindione übergehen.

Die beschriebene Autoxidation wäßriger Lösungen von basisch alkylierten 6- und 8-Aminochinolinen weist darauf hin, daß eine aktive Metabolisierung dieser Substanzen zu Chinolindionen nicht notwendig sein muß, sondern daß eine solche Umwandlung in sauerstoffreicher Umgebung freiwillig ablaufen kann.

Bei der in vitro-Oxidation des 8-Aminochinolins Plasmochin wird neben dem schon lange bekannten basisch alkylierten 5.6-Chinolindion 7 auch ein p-Chinon, 6-Methoxy-5.8-chinolindion (6), gebildet; dessen hohe in vitro- Aktivität läßt vermuten, daß dieser mögliche Metabolit ebenfalls mit für die Malariawirksamkeit und die toxischen Eigenschaften der 8-Aminochinoline verantwortlich gemacht werden kann.

Die in vivo- Bildung des von E.F. Elslager⁴⁰⁾ und P. Nickel⁷⁹⁾ geforderten basisch alkylierten 5.8-Chinolindions als wirksamer Metabolit der 6-Aminochinoline wurde durch das Auffinden von 3a in der Mäuseleber nach i. p. - Applikation von Ni 147/36 bestätigt.

Die angegebenen in vitro- Aktivitäten der Chinolindione zeigen, daß entgegen der bisherigen Anschauung nicht die basisch alkylierten Chinolindione, sondern diejenigen, bei welchen die basische Seitenkette oxidativ abgespalten worden ist, die in vitro aktiveren Metaboliten darstellen.

In vivo erwiesen sich die untersuchten Chinolindione, mit Ausnahme des o-Chinons 7, als wirkungsschwach. Das dürfte auf ungünstige Resorptions- und Verteilungsverhältnisse dieser hydrophilen Chinonderivate zurückzuführen sein, da die von der Arbeitsgruppe um T.H. Porter und K. Folkers^{90a,b, 87, 88, 89, 110)} dargestellten lipophilen Chinone sich in vivo bekanntlich als aktiv gegen Malaria erwiesen. Mit

Sicherheit werden Chinone an Serum- und intrazelluläres Eiweiß gebunden.

Die kausalprophylaktische Wirkung der 8-Aminochinoline ist am größten, wenn zwölf Stunden vor der Infektion appliziert wird; zum Zeitpunkt der Infektion ist die Plasmakonzentration an unverändertem Aminochinolin dann nur noch sehr gering. Dies spricht für die Bildung eines Chinolindiondepots in den Parenchymzellen der Leber, wodurch die primären Gewebsformen der Parasiten an Ort und Stelle erreicht werden. Im Einklang dazu steht bei den 6-Aminochinolinen das Auffinden des p-Chinons 3a in der Leber der Maus.

Das untersuchte, in vivo unwirksame 5-Aminochinolin wird in vitro nicht, wie H. P a u l u s ⁸⁵⁾ annahm, zu 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion, sondern zum isomeren 6-Methoxy-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion oxidiert, das jedoch eine vergleichbare in vitro-Aktivität aufweist. Da der Blutspiegel dieses 5-Aminochinolins ebenso, wie die der hochwirksamen 6-Aminochinoline, rasch absinkt ⁸⁵⁾, muß seine Forderung 3) jetzt folgendermaßen modifiziert werden: Rasches Absinken des Blutspiegels ist an die Bildung von nicht basisch alkylierten Chinolindionen gebunden.

Die Unwirksamkeit der von A. W o l f f ¹³¹⁾ synthetisierten 5-Aminochinoline dürfte darauf zurückzuführen sein, daß sie, wie er an Hand von Kaliumhexacyanoferrat(III)-Oxidationsversuchen beschreibt, bei physiologischem pH-Wert extrem schnell oxidiert werden. Das würde im Einklang mit der in vivo-Unwirksamkeit der untersuchten Chinolindione bedeuten, daß eine weitgehende oxidative Umwandlung eintritt, bevor der Parasit bzw. sein Aufenthaltsort erreicht wird, und damit das Pharmakon durch eine zu rasche unspezifische Metabolisierung in eine allgemein abgebundene, den Parasiten nicht in ausreichender Menge erreichende Wirkform wirkungslos wird.

Auf Grund dieser Anschauung ist das Auffinden malariawirksamer Derivate in der 5-Aminochinolin-Reihe wahrscheinlich, sofern ihnen Strukturen gegeben werden können, die eine Oxidation zu Chinolindionen er-

möglichen, eine zu rasche Oxidation jedoch verhindern.

Die in vitro-Aktivität des untersuchten 7,8-Chinolindions offenbart, daß auch bei den 7-Aminochinolinen malariawirksame Vertreter zu erwarten sind. Dies fand kürzlich durch L. H. S c h m i d t ¹³⁶⁾ mit dem bei einer Sporozoiten-Infektion des Rhesusaffen mit *P. cynomolgi* aktiven 7-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl)-amino-5,8-dimethoxy-chinolin (WR- 213.640) seine Bestätigung.

Zusammenfassend kann über die Bedingungen für eine kausalprophylaktische Wirksamkeit der 6- und 8-Aminochinolone gesagt werden:

1. Eine kausalprophylaktische Wirkung eines 6- bzw. 8-Aminochinolins ist immer dann gegeben, wenn es als intaktes Molekül resorbiert und verteilt wird, zum bzw. in den Parasiten gelangt und erst dort zur chinoiden Wirkform metabolisiert wird.
2. Es muß dazu rasch, aber nicht zu rasch in ein in vitro-aktives Chinolindion umwandelbar sein.
3. Die oxidative Umwandlung muß nicht an einen aktiven Metabolismus gebunden sein; sie ist in sauerstoffreicher Umgebung autoxidativ möglich.
4. Da die Chinolindione auch für die toxische Wirkung verantwortlich zu machen sind, ist eine Malariawirksamkeit der 6- und 8-Aminochinolone immer mit einer erheblichen toxischen Wirkung belastet.

2. Chemisch - theoretischer Teil

2.1. Bisher bekannte 5.6- und 5.8-Chinolindione

Die bisher bekannten 5.6- und 5.8-Chinolindione sind durch Oxidation von Mono- und Dihydroxy-chinolinen, Dialkoxy-chinolinen, Amino-hydroxy- oder Diamino-chinolinen dargestellt worden. Als Oxidationsmittel wurde eine Reihe von Reagenzien eingesetzt.

2.1.1. 5.6-Chinolindione

J. Mathëus⁷⁰⁾ erhielt 1887 das unsubstituierte 5.6-Chinolindion durch Oxidation von 5-Amino-6-hydroxy-chinolin mit Eisen(III)chlorid in saurer Lösung. N. L. Drake und Y. R. Pratt³³⁾ stellten 8-Amino-5.6-chinolindion durch Behandeln von 8-Amino-5.6-dihydroxy-chinolin bzw. 8-Amino-6-hydroxy-chinolin mit Sauerstoff in guten Ausbeuten her. H. -J. Teuber und S. Benz^{119b)} konnten eine Reihe von 5.6-Chinolindionen aus den entsprechenden 5-Hydroxy-chinolinen durch Reaktion mit Kalium-nitrosodisulfonat¹³³⁾ (Fremy's Salz) darstellen. P. Nickel⁸¹⁾ erhielt aus 6-(4-Diäthylamino-1-methylbutylamino)-5.8-dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (1a) durch Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat (III) 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5.6-chinolindion (2).

2.1.2. 5.8-Chinolindione

Durch Behandeln von 5-Amino-8-hydroxy-chinolin mit verd. Schwefelsäure und Kaliumdichromat in der Kälte erhielten O. Fischer und E. Renouf⁴⁴⁾ 5.8-Chinolindion. In gleicher Weise stellten W. G. Christiansen und M. A. Dolliver²⁷⁾ 6-Methyl-5.8-chinolindion und V. Petrow und B. Sturgeon⁸⁶⁾ eine Reihe methylsubstituierter 5.8-Chinolindione her. R. Long und K. Schofield^{69a)} synthetisierten eine große Anzahl von alkylsubstituierten

5.8-Chinolindionen, darunter 2.4-Dimethyl-5.8-chinolindion (10) aus 5.8-Dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin durch Ätherspaltung mit Bromwasserstoff und anschließender Oxydation mit Kaliumdichromat/Schwefelsäure. H.-J. Teuber und N. Götz¹²⁰⁾ setzten 8-Hydroxychinolin mit Kalium-nitrosodisulfonat¹³³⁾ zu 5.8-Chinolindion um. Y.T. Pratt und N.L. Drake^{92a)} sowie die Arbeitsgruppe um K. Folkers^{90a, b, 88)} stellten eine Reihe von 5.8-Chinolindionen durch Oxidation von 5.8-Diamino-chinolinen dar. In 6- und 7-Stellung halogenierte 5.8-Chinolindione erhielten C.W. Schellhammer und S. Petersen⁹⁸⁾ durch Umsetzung von 8-Hydroxy-5-amino-chinolinen mit $\text{NaBrO}_3/\text{HBr}$ bzw. HClO_3/HCl .

2.1.3. Basisch alkylierte 8-Amino-5.6-chinolindione

Das erste 5.6-Chinolindion mit 8-ständiger basischer Seitenkette wurde von C.R. Elderfield und E. Werble³⁹⁾ dargestellt. Sie erhielten 1950 durch oxidative Bestrahlung von Plasmochin^(R) mit UV-Licht ein Produkt, daß sie als 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5.6-chinolindion (7) identifizierten. N.L. Drake und Y.T. Pratt³³⁾ gewannen 1951 8-(5-Isopropylamino-amylamino)-5.6-chinolindion durch Schütteln einer Lösung des entsprechenden 5.6-Dihydroxy-chinolintrihydrobromids in wäßriger Natriumhydrogencarbonatlösung unter Luftzutritt; in reiner Form konnte es jedoch nicht gewonnen werden. W. Brackman und E. Havinga¹⁷⁾ und ebenso später Y.S. Tsizin und M.V. Rubtsov¹²³⁾, F.J. Bullock und J.F. Tweedie²²⁾ gewannen 8-Dialkylamino-5.6-chinolindione durch Oxidation von 6-Hydroxy-chinolinen mit Sauerstoff in Gegenwart von Kupfer(II)acetat und sekundären Aminen.

2.1.4. Basisch alkylierte 6-Amino-5,8-chinolindione

5,8-Chinolindione mit basischen Substituenten sind im Gegensatz zu basisch substituierten 5,6-Chinolindionen schon länger bekannt. O. Fischer und B. Renouf⁴⁴⁾ erhielten beim Kochen einer alkoholischen Lösung von 5,8-Chinolindion mit überschüssigem Anilin ein Gemisch aus 6- und 7-Anilino-5,8-chinolindion. R. Long und K. Schofield^{69b)} trennten dieses Isomerengemisch durch fraktionierte Kristallisation auf. R. Baltzly und E. Lorz⁷⁾ erhielten durch gleichzeitige Zugabe von Kupfer(II) acetat reine Addition in 6-Stellung, jedoch waren die Ausbeuten gering. Y.T. Pratt⁹¹⁾ ersetzte das Kupfer(II) acetat durch Cer(III) chlorid-heptahydrat und konnte mit gutem Ergebnis aromatische Amine ausschließlich in 6-Stellung an 5,8-Chinolindione addieren. C. Temple Jr., J.D. Rose und J.A. Montgomery^{118a)} stellten auf die gleiche Weise 6-(2-Diäthylamino-äthylamino)-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion dar. Y.T. Pratt und N.L. Drake^{92a)} und ebenso die Arbeitsgruppe um K. Folkers^{90b)} gewannen in 6-Stellung basisch alkylierte 5,8-Chinolindione durch Umsetzung der entsprechenden 6-Methoxy-5,8-chinolindione mit primären und sekundären Aminen.

2.2. Oxidation von basisch alkylierten 6- und 8-Amino-chinolinen mit Kaliumhexacyanoferrat (III)

(Formelschema 1)

2.2.1. Oxydation von 6-Amino-chinolinen

Nachdem P. Nickel⁸¹⁾ die Oxidierbarkeit von basisch alkylierten, verschieden substituierten 5-, 6-, 7- und 8-Amino-chinolinen mit Kaliumhexacyanoferrat(III) festgestellt hatte, haben H. Hettche⁵³⁾, H. Paulus⁸⁵⁾, A. Wolff¹³¹⁾, H.-R. Seidel¹⁰⁷⁾ und

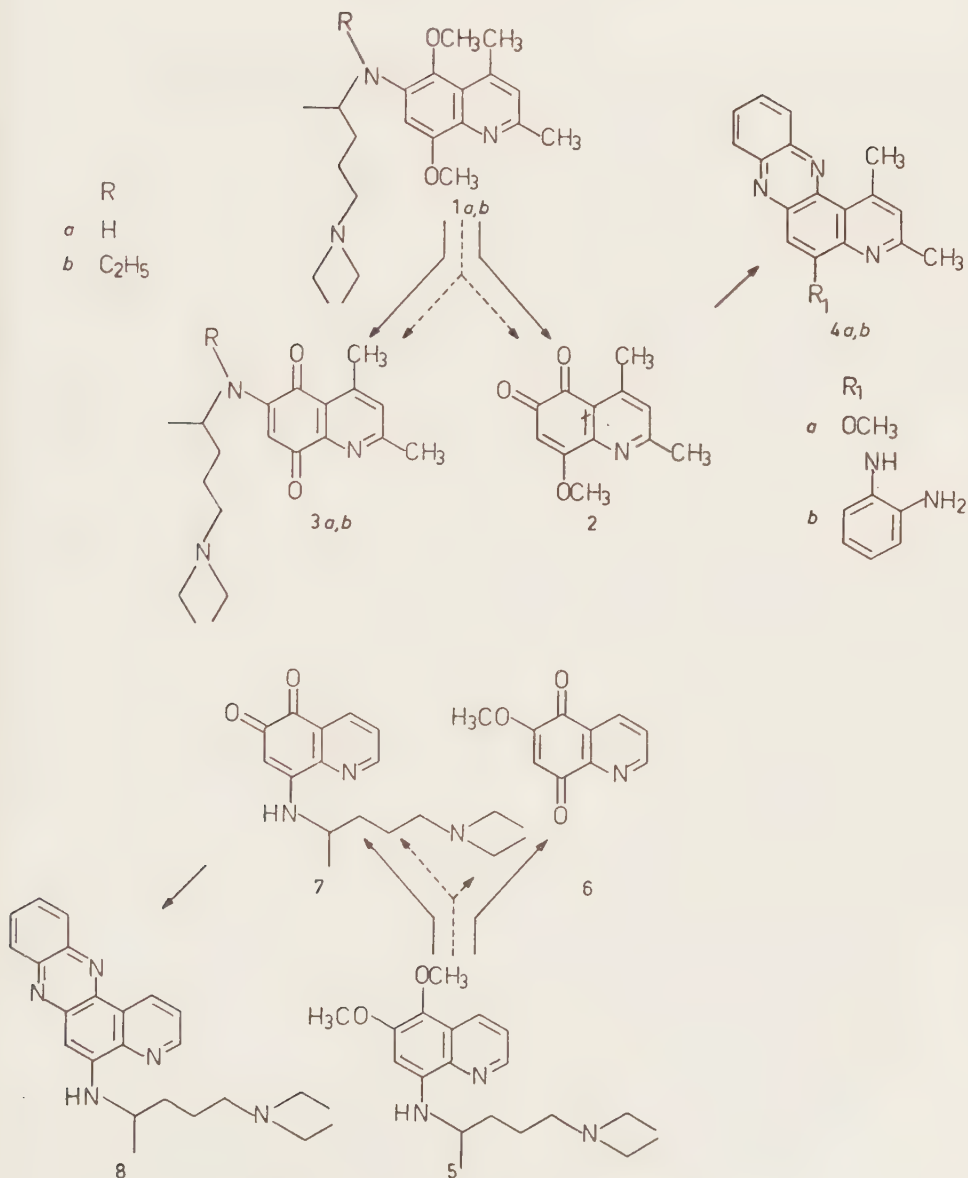
K. -G. L i s s o n ⁶⁸⁾ mit Hilfe dieser Methode die Oxidationsgeschwindigkeiten einer Reihe dieser Verbindungen durch pH-stat-Messungen verglichen. In den Oxidationsansätzen einiger 6- und 5-Amino-chinoline konnte von P. N i c k e l ⁸¹⁾, H. P a u l u s ⁸⁵⁾ und von mir die Bildung von 5.6-Chinolindionen mittels DC und GC nachgewiesen werden. Im präparativen Maßstab ist von P. N i c k e l ⁸¹⁾ aus 1a das 5.6-Chinolindion 2 ebenfalls durch Kaliumhexacyanoferrat(III) -Oxidation erhalten worden.

Bei der von mir durchgeführten Darstellung von 2 nach dieser Methode fiel die ausgeprägte pH-Abhängigkeit der Richtung der Oxidation auf. Wurde im Neutralbereich oxidiert, so erhielt ich in guten Ausbeuten 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5.6-chinolindion (2) neben sehr wenig, nur im DC nachweisbarem 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2.4-dimethyl-5.8-chinolindion (3a). Wurde dagegen die Oxidation im pH-Bereich um 5 ausgeführt, so verlief die Reaktion wesentlich langsamer, und der Anteil an basisch alkyliertem 3a gegenüber 2 stieg bedeutend an. In einem orientierenden Versuchsansatz bei pH 4.8 - 5.0 betrug das Verhältnis von Verbindung 3a zu 2 etwa 4:1. Unter den gleichen Bedingungen konnte im DC nach Umsetzung von 1b das N-Äthyl-5.8-Chinolindion 3b nachgewiesen werden.

2.2.2. Oxidation von 8-Amino-chinolinen

Bei einem Vergleich von Oxidationsgeschwindigkeiten hat H. P a u l u s ⁸⁵⁾ gefunden, daß sich 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-6-methoxy-chinolin bei pH 2.2 und das analoge 2.4-Dimethylderivat bei pH 3.6 unerwartet langsam oxidieren ließen. N.L. D r a k e und Y.T. P r a t t ³³⁾ konnten bei ihrer Oxidationsmethode mit Sauerstoff in Natriumhydrogencarbonat-Lösung aus 8-(5-Isopropylamino-amylamino)-6-methoxy-chinolin (Pentaquine^(R)) kein entsprechendes 5.6-Chinolindion nachweisen, wohl aber bei der gleichen Behandlung der entsprechenden 5.6-Dimethoxy- bzw. 5.6-Dihydroxy-Verbindung. Auch A. W o l f f ¹³¹⁾ beschreibt das

FORMELSCHEMA 1



Kaliumhexacyanoferrat(III)-Oxidation $\longrightarrow$

Silber(III)-oxid-Oxidation $\cdots\cdots\cdots\longrightarrow$

Auffinden eines 5.6-Chinolindions mittels DC bei der Kaliumhexacyanoferrat (III)-Oxidation von 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5.6-dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin.

So erschien es am aussichtsreichsten, zur Synthese von Verbindung 7, von der 5.6-Dimethoxy-Verbindung (5)¹⁰¹⁾ auszugehen. Die Richtung der Kaliumhexacyanoferrat(III)-Oxidation zeigte hier ebenfalls eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit. Eine mehrstündige Behandlung von 5 mit der zehnfach äquivalenten Menge Kaliumhexacyanoferrat(III) bei pH 5 führte in befriedigenden Ausbeuten zum basisch alkylierten o-Chinon 7; wurde die Oxidation dagegen im alkalischen Milieu (pH = 8.5) durchgeführt, so wurde hauptsächlich das p-Chinon 6 erhalten (DC).

2.3. Oxidative Ätherspaltung mit Silber(II)oxid

(Formelschema 1)

W.F. Bondinell, C.D. Snyder und H. Rapoport^{15a,b, 115)} haben mit Silber(II)oxid⁵⁹⁾ in saurem Milieu in kaltem, wäßrigen Dioxan eine schonende, selektive, oxidative Demethylierung bei Hydrochinonäthern in der Benzol- und Naphthalinreihe durchgeführt und in sehr guten Ausbeuten 1.2- und 1.4-Chinone erhalten. Als Säure wurde Salpeter-, Perchlor- oder Phosphorsäure verwendet. Diesen Befund versuchte ich auf die o- und p-Dimethoxy-Derivate (Verbindungen 1a, 1b und 5) basisch alkylierter 6- und 8-Amino-chinoline zu übertragen, in der Hoffnung, daß die basische Seitenkette intakt erhalten bleibt. Bei der Behandlung von 1a bzw. 1b mit Silber(II)oxid / 6 N Salpetersäure erhielt ich jedoch ein reines Gemisch von 5.6- und 5.8-Chinolindionen (2 und 3a, bzw. 2 und 3b); bei der Reaktion von 5 entstanden dagegen, neben wenig 5.8-Chinolindion 6, das basisch alkylierte 5.6-Chinolindion 7 und eine Reihe anderer nicht identifizierter, tief gefärbter Oxidationsprodukte.

2.4. Pyrido [3, 2-a] phenazine

(Formelschema 1)

Die Umsetzung von o-Chinonen mit o-Phenylendiamin zu Derivaten des Chinoxalins ist eine häufig benutzte Methode zur Identifizierung. Josephson und Mitarb.⁶⁰⁾, Drake und Pratt³³⁾, Teuber und Mitarb.^{119b)} und H. Paulus⁸⁵⁾ setzten z.B. 5,6-Chinolindione mit o-Phenylendiamin zu Pyrido [3, 2-a] phenazinen um und wiesen so die Ausgangschinone mit Hilfe von IR, UV und GC nach.

Die Bildung erfolgt in der Regel durch Kondensation der o-Chinone mit o-Phenylendiamin in Eisessig in guten Ausbeuten.

Auf diese Weise konnte ich aus 7 nach Dickschichtreinigung in über 40 proz. Ausbeute rotes, öliges 5-(Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-pyrido [3, 2-a] phenazin (8) erhalten, das bereits bei Josephson und Mitarb.⁶⁰⁾ erwähnt, jedoch nicht näher beschrieben ist. In Lösung fluoresziert 8 sehr stark grüngelb; mit Naphthalin-1,5-disulfonsäure erhält man ein gut kristallisierendes, leuchtend rotes Salz.

Dagegen stieß die Umsetzung von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) mit o-Phenylendiamin in Eisessig, nach H. Paulus⁸⁵⁾, im präparativen Maßstab auf Schwierigkeiten. Als leicht zu isolierendes Hauptprodukt erhielt ich nicht 4a, sondern 5-(2-Amino-anilino)-1,3-dimethyl-pyrido [3, 2-a] phenazin (4b), was durch MS und IR bewiesen werden konnte. Demnach hatte zunächst teilweise eine Aminolyse der 8-ständigen Methoxygruppe durch o-Phenylendiamin stattgefunden, wobei die Ausgangsverbindung 5 als vinyloger Ester reagiert, und anschließend erst die gewünschte Kondensation. Als der Eisessig durch absolutes Äthanol als Lösungsmittel ersetzt wurde, konnte 5-Methoxy-1,3-dimethyl-pyrido [3, 2-a] phenazin (4a) im präparativen Maßstab mit befriedigenden Ausbeuten dargestellt werden. Eine gas-chromatographische Bestimmung der Ausbeuten dieser Kondensation in verschiedenen Lösungsmitteln (absol. Äthanol, absol. Methanol, Methylenchlorid, Eisessig) unter sonst gleichen Bedingungen zeigte, daß sich in jedem

Falle das gewünschte Phenazinderivat 4a bildet. Die besten Umsatzraten für 4a wurde im analytischen Maßstab in Eisessig erhalten; die Isolierung von 4a jedoch ist durch die gleichzeitige hohe Bildungsrate von 4b erschwert.

Auf der Suche nach einem inneren Standard für eine angestrebte quantitative gas-chromatographische Bestimmung des 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5.6-chinolindion (2) als Phenazinderivat 4a, wurde versucht, das noch unbekannte, unsubstituierte Pyrido[3.2-a]phenazin durch Kondensation von 5.6-Chinolindion-sulfat⁷⁰⁾ mit o-Phenylendiamin darzustellen. Keiner der durchgeführten Ansätze führte zum Ziel.

Deshalb diente mir das bekannte 1.5-Dimethyl-pyrido[3.2-a]phenazin^{119b)} als innerer Standard, wobei das dazu benötigte 4.8-Dimethyl-5.6-chinolindion^{119b)}, wie bei H.-J. Teuber und S. Benz beschrieben, durch Oxidation von 5-Hydroxy-4.8-dimethyl-chinolin mit Kaliumnitrosodisulfonat erhalten wurde.

2.5. 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2.4-dimethyl-5.8-chinolindion (3a)

(Formelschema 2)

Da bei H. Paulus⁸⁵⁾ der Versuch, 3a durch Entmethylierung von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5.8-dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (1a)⁷⁹⁾ mit Bromwasserstoffsäure und anschließender Luftoxidation darzustellen, ohne Erfolg verlief, ging ich zur Synthese von 3a zunächst von 6-Methoxy-2.4-dimethyl-5.8-chinolindion (15)⁸¹⁾ aus. Als vinyloger Ester sollte es durch Aminolyse mit 4-Diäthylamino-1-aminopentan die gewünschte Verbindung ergeben. Ebenso wie vor mit P. Nickel⁸¹⁾, erhielt ich dunkle, schmutzige Öle. Daher überprüfte ich die Darstellungsmethode⁸¹⁾ für 6-Methoxy-2.4-dimethyl-5.8-chinolindion (15). Sie erfolgte durch Ätherspaltung von 5.8-Dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (9)^{65, 49)} mit Bromwasserstoffsäure zur Dihydroxy-

verbindung, anschließender Oxidation mit Kaliumdichromat in verdünnter Schwefelsäure bei 0°C zum entsprechenden 5,8-Chinolindion ^{69a)} (10); durch Addition von Chlorwasserstoff durch Einleiten von trockenem Chlorwasserstoffgas ^{92b)} in eine Lösung von 10 in wasserfreiem Benzol, gefolgt von erneuter Kaliumdichromat-Oxidation, wurde 6-Chlor-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion ⁸¹⁾ (11) erhalten; im letzten Schritt wurde dann das Chloridanion beim Kochen mit methanolischer Natriummethylatlösung durch die Methoxygruppe substituiert ⁸¹⁾, wobei die Zugabe von nur der halben äquivalenten Menge an Natriummethylatlösung allein gute Ausbeuten sicherstellte.

Die Anlagerung von Chlorwasserstoff an 5,8-Chinolindionen führt, wenn nicht absolut wasserfrei verfahren wird, nicht einsinnig zu 6-Chlor-5,8-dihydroxy-chinolin, sondern man erhält daneben auch in gewissem Umfang 7-Chlor-5,8-dihydroxy-chinoline ^{92b, 69b)}. Damit würde die nachfolgende Methoxy-Substitution und so auch die Aminolyse zu einem Gemisch von basisch alkylierten 6-, bzw. 7-Amino-5,8-chinolindionen führen.

Daher stellte ich zum Vergleich das Schlüsselprodukt, 6-Methoxy-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (15), aus 8-Amino-6-methoxy-2,4-dimethyl-chinolin (12) dar, da hier die Position der Methoxy-gruppe vorgegeben war. Nach der Methode von K. N. Campbell ²³⁾ wurde 12 mit diazotierter Sulfanilsäure in 5-Stellung gekuppelt, und der Azofarbstoff 13 mit Natriumdithionit in 5,8-Diamino-6-methoxy-2,4-dimethyl-chinolin (14) überführt; Oxidation mit Kaliumdichromat in verdünnter Schwefelsäure lieferte 15. Die so erhaltene Substanz erwies sich als identisch mit der nach dem vorher beschriebenen Weg hergestellten. Eine weitere Bestätigung erhielt ich durch die Synthese des isomeren 7-Methoxy-2,4-dimethyl-5,8-chinolindions (25) durch oxidative Demethylierung von 5,7,8-Trimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (24) mit 40 proz. Salpetersäure. Das 7-Methoxy-Analoge zeigte ein abweichendes Schmelzverhalten, IR-Spektrum und Massenspektrum.

Nachdem die Identität und Einheitlichkeit der Verbindung 15 gesichert war, gelang es mit Hilfe aufwendiger Reinigungsmethoden 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (3a) als oranges Pulver vom Schmp. 47°C darzustellen.

Ein zweiter Syntheseweg zu 3a beruht auf der Arbeit von Y. T. Pratt⁹¹⁾, welche festgestellt hat, daß sich aromatische Amine in Gegenwart von 0,1 Äquivalenten Cer(III) chlorid-heptahydrat einsinnig an die 6-Stellung in 5,8-Chinolindion addieren. Diese Reaktion übertrugen C. Temple Jr. und Mitarb.^{118a)} auf die oxidative Addition von 2-Diäthylamino-äthylamin oder p-Chlorthiophenol an 5,8-Chinolindione.

So konnte auch ich durch 78-stündiges Rühren von 2,4-Dimethyl-5,8-chinolindion (10) mit der äquimolaren Menge 4-Diäthylamino-1-aminopentan unter katalysierendem Zusatz von Cer(III) chlorid-heptahydrat das 3a als rotes Öl gewinnen, welches nach mehrwöchigem Stehen bei $+4^{\circ}\text{C}$ zu einem orangefarbenen, öldurchsetzten Kristallkuchen erstarrte.

2.6. Versuche zur Reduktion von N-acetyliertem Plasmochin^(R)

(Formelschema 3)

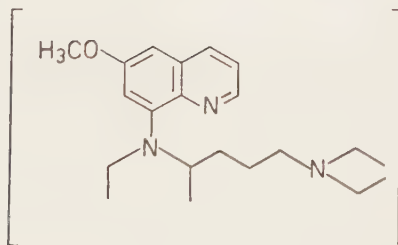
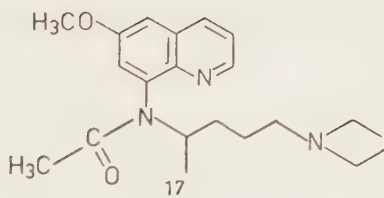
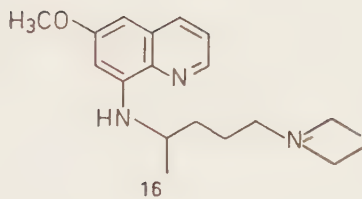
Zu einer Darstellung von einem basisch alkylierten 8-Aminochinolin mit tertiärer 8-Aminogruppe ist eine direkte Alkylierung der sekundären aromatischen Aminogruppe in 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-6-methoxy-chinolin (16) (Plasmochin^(R)) nicht geeignet, da der endständige, tertiäre Stickstoff quaternisiert wird. Daher wurde zunächst eine Acetylgruppe eingeführt, die anschließend zur Äthylgruppe reduziert werden sollte.

Derartige Acetylierungen zu den tertiären Acetamino-Verbindungen sind in der Literatur bei basisch alkylierten 6- und 8-Amino-chinolinen mit Acetylchlorid oder Acetanhydrid beschrieben^{101, 26, 107, 68)} und gelingen nicht mit basisch alkyliertem 4-Amino-chinolin⁶⁸⁾. Als beste Acetylierungsmethode erwies sich in meinem Fall die von G.V. Chelintsev und B.M. Dubinin²⁶⁾ beschriebene Umsetzung von ca. äquimolaren Mengen Amino-chinolin und Acetanhydrid bei 150°C. Zur Reduktion des auf diese Weise gewonnenen Amids (17)¹²⁹⁾ (SN 12.448) erschien Lithiumaluminiumhydrid aussichtsreich.

Solche Reduktionen sind von den Aniliden¹⁰⁴⁾ und von den tertiären 6-Acetamino-chinolin^{107, 68)} bekannt. Während unsubstituierte und N-monoalkylierte Amide glatt zu den entsprechenden primären und sekundären Aminen reduziert werden, spalten Dialkyl- und Diarylamide und Acylverbindungen von Stickstoffheterocyclen, deren Iminogruppe schwach sauren Charakter besitzt, wie z.B. im Pyrrol, leicht zurück, wobei der Säurerest zum entsprechenden Alkohol oder in einigen Fällen nur zum Aldehyd reduziert wird⁵⁶⁾. Die Rückspaltung ist auch immer dann die bevorzugte Reaktion, wenn eine sterische Hinderung vorliegt oder, wenn der Amid-Stickstoff in ein Resonanz-System eingebaut ist^{56, 126)} und sein Elektronenpaar zur Mesomerie zur Verfügung stellt⁵⁶⁾.

Die bisher genannten Gründe für eine nicht normal verlaufende Lithiumaluminiumhydridreduktion tertiärer Amide zu tertiären Aminen könnten

FORMELSCHEMA 3



die Ursache für die schlechten Ausbeuten in der 6-Amino-chinolin-Reihe sein ¹⁰⁷⁾.

Bei der von mir durchgeführten Reduktion in der 8-Amino-chinolin-Reihe konnte jedoch überhaupt kein erwünschtes tertiäres Amin gewonnen werden, sondern es wurde, neben einigen Nebenprodukten in geringen Mengen, als Hauptprodukt die entacetylierte Verbindung erhalten.

Eine Erklärung, neben den oben genannten Gründen, könnte darin zu finden sein, daß Lithiumaluminiumhydridreduktionen dann vorzeitig stehenbleiben, wenn sich das Aluminium-Atom im Komplex an mehrere Gruppen des gleichen Moleküls chelatartig binden kann; so erhält man bei der Reduktion von Oxalsäurediester nicht Äthylenglycol, sondern Glyoxal, bei der Reduktion von Asparaginsäure-diester nicht die erwartete Dihydroxy-Verbindung, sondern 2-Amino-Succindialdehyd ⁵⁶⁾.

Bei dem vorliegenden acetylierten 8-Amino-chinolin wäre eine solche Chelatisierung ebenfalls denkbar; die Hydrolyse liefert dann entacetyliertes 8-Amino-chinolin zurück und Acetaldehyd, das zum Äthanol weiter reduziert werden kann.

Der Versuch durch Austausch des Amid-Sauerstoff durch Schwefel mit Phosphor-pentasulfid und anschließender reduktiven Entschwefelung mit Raney-Nickel / Wasserstoff ¹⁰⁴⁾ brachte ebenfalls keinen Erfolg.

2. 7. 5. 7. 8-Trimethoxy-2. 4-dimethyl-chinolin (24)

(Formelschema 4)

Zur Synthese von 2.4-Dimethyl-chinolin dienen der Ringschluß nach A. C o m b e s ²⁹⁾, sauer katalysierte Addition von aromatischen Aminen an Acetylaceton zum Enamin und anschließende Kondensation in konz. Schwefelsäure oder in Polyphosphorsäure ⁷⁹⁾, oder allgemeiner der Ringschluß nach C. B e y e r ¹³⁾, Kondensation von aromatischen Aminen mit Äthylidenaceton in Salzsäure mit Nitrobenzol oder Arsensäure ⁵⁵⁾ als Oxidationsmittel.

2. 7. 1. Ringschluß nach A. C o m b e s

Die Synthesemöglichkeiten dieser Ringschluß-Reaktion sind begrenzter als die Möglichkeiten des universelleren 'Beyer-Ringschlusses'. Die Begrenzungen sind in der Stellung einiger Substituenten am aromatischen Amin begründet ^{18, 96)}. Befinden sich z. B. Methoxygruppen in ortho- oder, und para-Stellung zum Stickstoff des Enamins, so verhindern sie den nachfolgenden Ringschluß, sofern nicht noch zusätzlich eine zweite oder dritte Methoxygruppe in meta-Stellung, 3- oder 5-Stellung, zum Stickstoff des Enamins vorhanden ist. So gelang es F. L i o n s ⁶⁴⁾, 3.4.5- und 2.3.4- Trimethoxy-anilin mit Acetylaceton zu 5.6.7-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin bzw. 6.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin zu kondensieren.

Im Einklang zu obigem Befund konnte ich aus 2.3.5-Trimethoxy-anilin (22) und Acetylaceton das Enamin ²³ herstellen und in konz. Schwefelsäure in guten Ausbeuten zu 5.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (24) ringschließen.

2.7.2. Ausgangsverbindungen

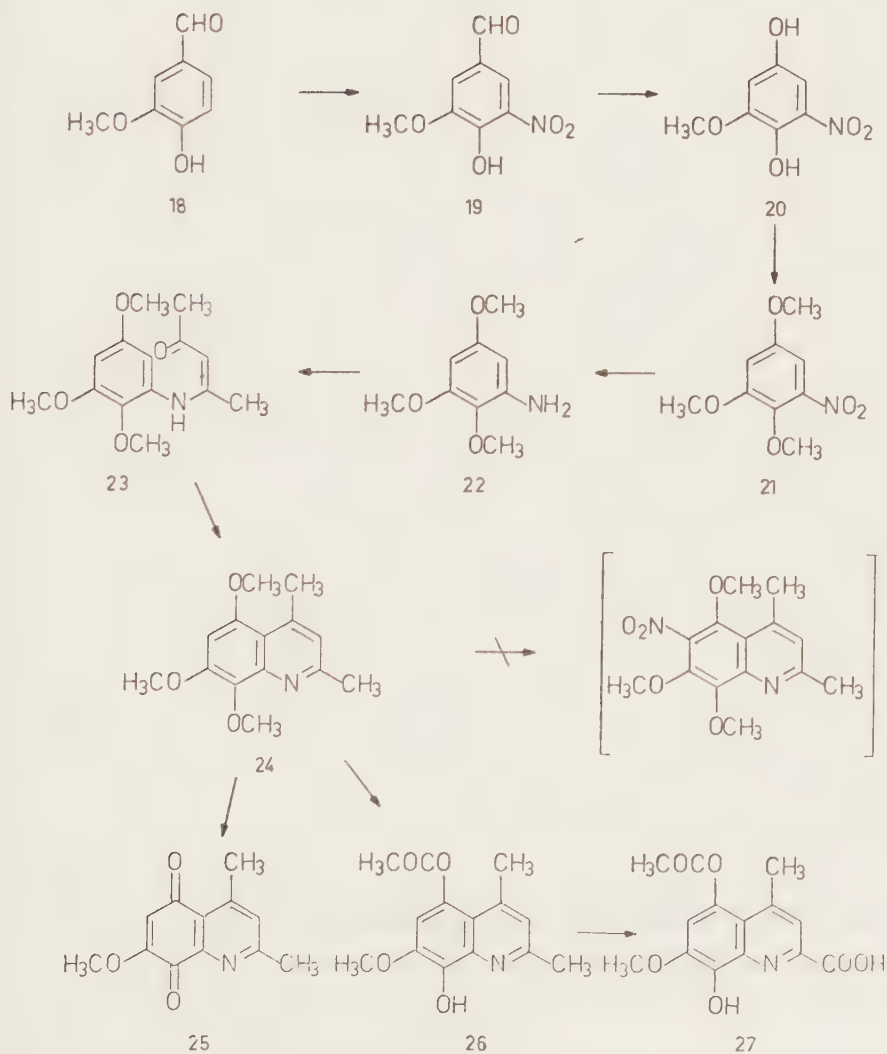
Zur Darstellung von 2.3.5-Trimethoxy-anilin (22) ging ich von Vanillin (18) aus, das in Eisessig/Propionsäure (10+2) mit 65proz. Salpetersäure zu 4-Hydroxy-3-methoxy-5-nitro-benzaldehyd¹¹³⁾ (19) nitriert wurde. In einer Dakin-Reaktion³¹⁾ nach der Vorschrift von H. Richtzenhain und P. Nippus⁹⁵⁾ wurde durch Behandeln mit alkalischer Wasserstoffsuperoxid-Lösung die Carbonylfunktion durch eine Hydroxygruppe ersetzt, und ich erhielt 3-Methoxy-5-nitro-hydrochinon (20), welches in wasserfreiem Aceton unter Zusatz von wasserfreiem Kaliumcarbonat mit Dimethylsulfat in 1.3.4-Trimethoxy-5-nitro-benzol⁹⁵⁾ (21) überführt wurde. Die Reduktion von (21) zum Anilinderivat⁹⁵⁾ 22 erfolgte in Toluol mit Eisen/Eisessig mit sehr guten Ausbeuten.

2.7.3. Versuche zur Darstellung von 5.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-6-nitro-chinolin bzw. 6-Amino-5.7.8-trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin.

Eine Einführung einer Nitrogruppe in die 6-Stellung von 5.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (24), analog der Überführung von 5.8-Dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin in das 6-Nitro-Derivat⁷⁹⁾, gelang mit keinem der im Versuchsteil angegebenen Nitrierungsreagenzien. In der Regel führten die Nitrierversuche zu einer Reihe von, im Dünnschichtchromatogramm erkennbaren, tiefgefärbten Oxidationsprodukten. In drei Fällen jedoch führte das Einwirken eines Nitrierungsmittels zu definierten Endprodukten:

- a) Die Behandlung mit 40proz. Salpetersäure, bzw. mit Trifluoracetanhydrid/rauchende Salpetersäure lieferte in guter Ausbeute 7-Methoxy-2.4-dimethyl-5.8-chinolinindion (25), welches durch Massenspektrum, IR- und UV-Spektrum gesichert werden konnte. Eine solche oxidative Ätherspaltung durch Salpetersäure ist bei solchen 1.4-Dimethoxy-benzolen, die elektronenziehende Substituenten in der 2- und 5-

FORMELSCHEMA 4



Stellung besitzen, bekannt ⁷⁶⁾. Die oxidative Demethylierung ist besonders durch das Vorhandensein von zusätzlichen Methoxygruppen im 1,4-Dimethoxy-benzol begünstigt. So führt z. B. die Behandlung von 1,2,4-Trimethoxy-6-propyl-benzol mit Salpetersäure nicht zu einem nitrierten Produkt, sondern zu 2-Methoxy-6-propyl-1,4-benzochinon ¹²²⁾.

b) Die Behandlung mit Acetanhydrid/rauchender Salpetersäure führte dagegen zu einem gut kristallisierendem Gemisch zweier Substanzen. Das Hauptprodukt stellt mit großer Sicherheit 5-Acetoxy-8-hydroxy-7-methoxy-2,4-dimethyl-chinolin (26) dar. Im IR-Spektrum ist bei 1740 cm^{-1} eine starke Absorptionsbande, die auf einen Arylester hinweist; das Fraktionierungsschema des Massenspektrums und eine Gelbfärbung mit Al^{+3} -Ionen läßt auf eine freie 8-Hydroxygruppierung schließen. Demnach trat bei der Reaktion zunächst eine Ätherspaltung ein, gefolgt von einer Acetylierung in der 5-Stellung. Bei der zweiten Substanz handelt es sich wohl um 5-Acetoxy-8-hydroxy-7-methoxy-4-methyl-chinaldinsäure (27). Hierfür spricht ebenfalls das Massenspektrum und das IR-Spektrum (s. Kap. A. 2.10.).

Der Versuch, über die 6-Nitroso-Verbindung von 24 zur angestrebten 6-Amino-Verbindung zu gelangen, schlug ebenfalls fehl; die Behandlung von 24 mit Natriumnitrit/konz. Schwefelsäure führte, ähnlich wie Salpetersäure, zu einer Reihe von Oxidationsprodukten.

Es bot sich noch die Möglichkeit an, über eine Friedel-Crafts-Acylierung mit anschließender Oximbildung und Beckmann-Umlagerung das 6-Amino-5,7,8-trimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin anzustreben ⁷⁴⁾. Obwohl Acylierungsreaktionen von Trimethoxy-benzolen mit Acetanhydrid/Polyphosphorsäure beschrieben sind ^{97, 84)}, wobei unter Verwendung von Acylhalogenid/Aluminiumchlorid eine Ätherspaltung eintreten kann, wenn eine Methoxygruppe in ortho-Stellung zur eintretenden Acylgruppe steht ⁴⁶⁾, gelang es mir mit dieser Methode nicht, eine Acetylgruppe in 6-Stellung einzuführen.

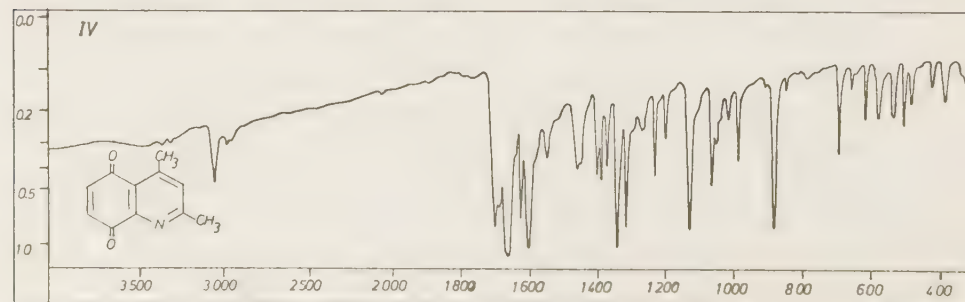
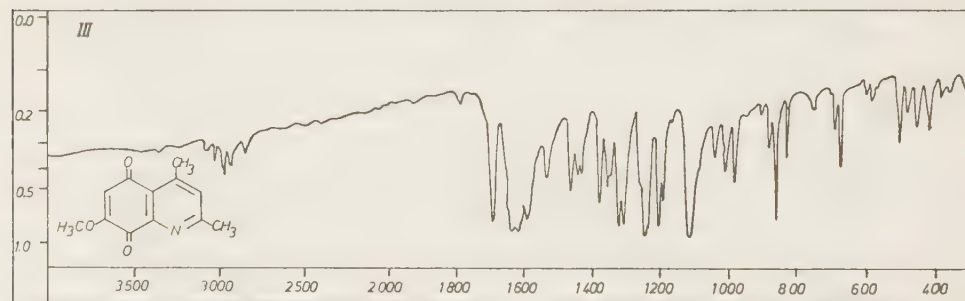
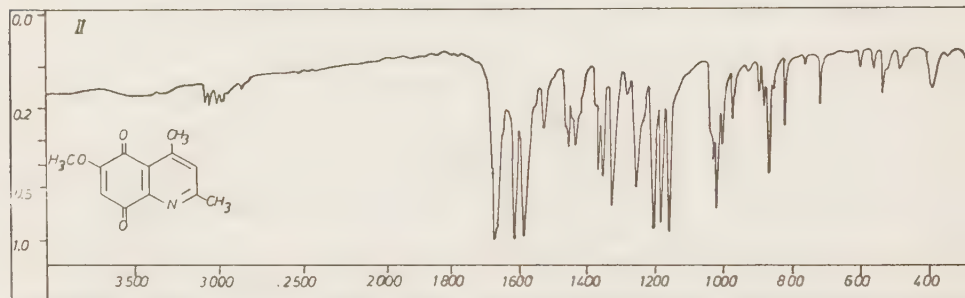
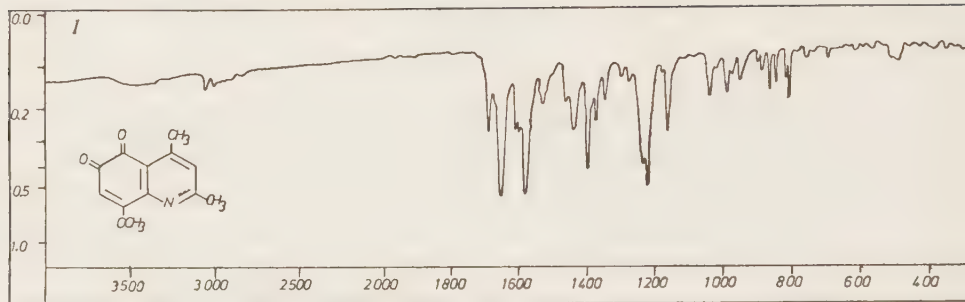
Auch eine Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure zu einem Azofarbstoff trat nicht ein, dessen reduktive Spaltung zur 6-Amino-Verbindung hätte führen können.

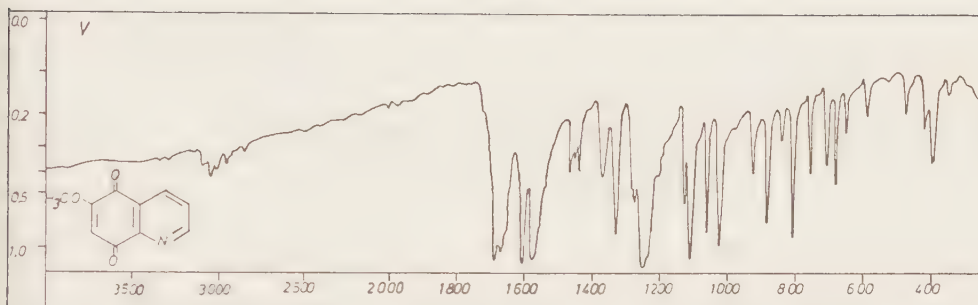
2.8. IR - Spektren

2.8.1. 5.6- und 5.8-Chinolindione

Repräsentativ für das Chinolindionsystem ist im IR-Spektrum das Gebiet zwischen 1500 und 1700 cm^{-1} . Innerhalb dieses Bereiches liegen die C=O- und C=C-Valenzschwingungen, bzw. die Valenzschwingungen, die auf dem System C=C konjugiert mit C=O beruhen. Die C=O-Valenzschwingungen der hier besprochenen Verbindungen sind zwischen 1650 und 1690 cm^{-1} und die C=C-Valenzschwingungen unterhalb davon bis ca. 1530 cm^{-1} zu finden. Um den Einfluß der Methoxy-Substitution am chinoiden Benzolring und der Methyl-Substitution am Pyridinring auf die Lage der C=O-Valenzschwingung erkennen zu können, wurden neben den Spektren der beschriebenen Verbindungen (Abbildung 8, I-III, auch IR-Spektren (IV und V) von 2.4-Dimethyl-5.8-chinolindion (10) und 6-Methoxy-5.8-chinolindion ^{92a)} dargestellt.

Das IR-Spektrum des 5.6-Chinolindions (I) unterscheidet sich von den Spektren der 5.8-Chinolindione durch das Auftreten eines, sich von der C=O-Valenzschwingung (1654 cm^{-1}) deutlich absetzenden Trabanten (1688 cm^{-1}) mittlerer Intensität. Ein solcher Trabant bei höheren Frequenzen tritt auch bei o-Benzochinonen, 1.2-Naphthochinonen ¹⁰⁾ und den von H. -J. Teuber und S. Benz hergestellten 5.6-Chinolindionen auf ^{119b)} und kann somit mit zur Unterscheidung von o- und p-Chinonen herangezogen werden.





2,4-Dimethyl-5,8-chinolindion (IV) zeigt ebenfalls neben der starken C=O-Absorptionsbande bei 1646 cm^{-1} einen Trabanten bei 1682 cm^{-1} , der sich jedoch nicht so eindeutig von der Hauptbande absetzt. Durch Substitution in 6- oder 7-Stellung mit einer Methoxygruppe taucht in diesem Bereich nur noch eine starke Bande auf (1674 bzw. 1689 cm^{-1}). Nimmt man zum Vergleich aus den beiden Banden des 2,4-Dimethyl-5,8-chinolindions den Mittelwert¹⁰⁾ mit 1664 cm^{-1} an, so ist augenfällig, daß durch Einführung einer Methoxygruppe in die 6- bzw. 7-Position die Absorptionsbande zu höheren Frequenzen hin verschoben wird. Die Ursache dieser Verschiebung dürfte im +M-, bzw. schwächeren -I-Effekt der Methoxygruppe liegen. Ebenso steht sie im Einklang mit der Tatsache, daß 6- bzw. 7-Methoxy-5,8-chinoline als vinyloge Ester aufzufassen sind. Der Einfluß der Methylierung in 2- und 4-Stellung des Pyridinringes in 5,8-Chinolindionen läßt sich aus den Spektren II und V ersehen. Eine Verschiebung tritt nicht auf (Mittelwert der beiden bei V auftretenden C=O-Banden 1685 und $1668 = 1674\text{ cm}^{-1}$), jedoch eine Aufspaltung in zwei schwach getrennten Banden.

2.9. UV - Spektren

Die abgebildeten UV-Spektren (Abb. 9, Abb. 10) wurden in Chloroform bis etwa 240 nm vermessen.

2.9.1. Chinolindione

Um den Einfluß einer Methoxy-Substitution im chinoiden Ring bzw. der 2.4-Dimethyl-Substitution im Pyridinring der 5.8-Chinolindione auf die Lage der Absorptionsmaxima erkennen zu können, wurden zusätzlich Spektren von 2.4-Dimethyl-5.8-chinolindion (10) und 6-Methoxy-5.8-chinolindion (6) aufgenommen.

8-Methoxy-2.4-dimethyl-5.6-chinolindion (2), Spektrum I, zeigt bei 385 nm einen $\tilde{\Pi} \longrightarrow \tilde{\Pi}^*$ -Übergang mittlerer Intensität. Die Breite der Absorptionsbande weist darauf hin, daß sich in diesem Bereich zwei $\tilde{\Pi} \longrightarrow \tilde{\Pi}^*$ -Übergänge überlagern, wovon der eine dem chinoiden System, der zweite dem aromatischen System des Pyridinringes zuzuordnen wäre. Absorptionsbanden höherer Intensität treten bei 257 nm und als Schultern bei 251 und 272 nm auf. Sie beruhen wohl ebenfalls auf $\tilde{\Pi} \longrightarrow \tilde{\Pi}^*$ -Übergänge, sowohl vom Chinonsystem als auch vom aromatischen Pyridinring verursacht. Ein schwacher $n \longrightarrow \tilde{\Pi}^*$ -Übergang ($\log \epsilon = 1,7$) ist bei 490 nm zu finden (im Spektrum nicht eingezeichnet).

Das entsprechend substituierte 6-Methoxy-2.4-dimethyl-5.8-chinolindion (15), Spektrum II, weist den $\tilde{\Pi} \longrightarrow \tilde{\Pi}^*$ -Übergang des Chinonsystems im kurzwelligeren Bereich (333 nm, sh) auf. Die Absorptionsbanden im energiereicheren Bereich sind besser differenziert. Zwei intensive Peaks liegen bei 278 und 249 nm.

Eine Verschiebung der Methoxygruppe von der 6- in die 7-Stellung bei 25, Spektrum III, ist für die Lage der Banden ohne wesentliche Bedeutung.

Gravierender dagegen wirkt sich erwartungsgemäß der Wegfall dieser Methoxygruppe aus. Wie das Spektrum IV von 2.4-Dimethyl-5.8-chinolindion (10) zeigt, erfolgt durch eine derartige Methoxy-Substitution im

— I (2)
- - II (15)
... III (25)

— IV (10)
- - V (6)
... VI (3a)

20

25

30

35

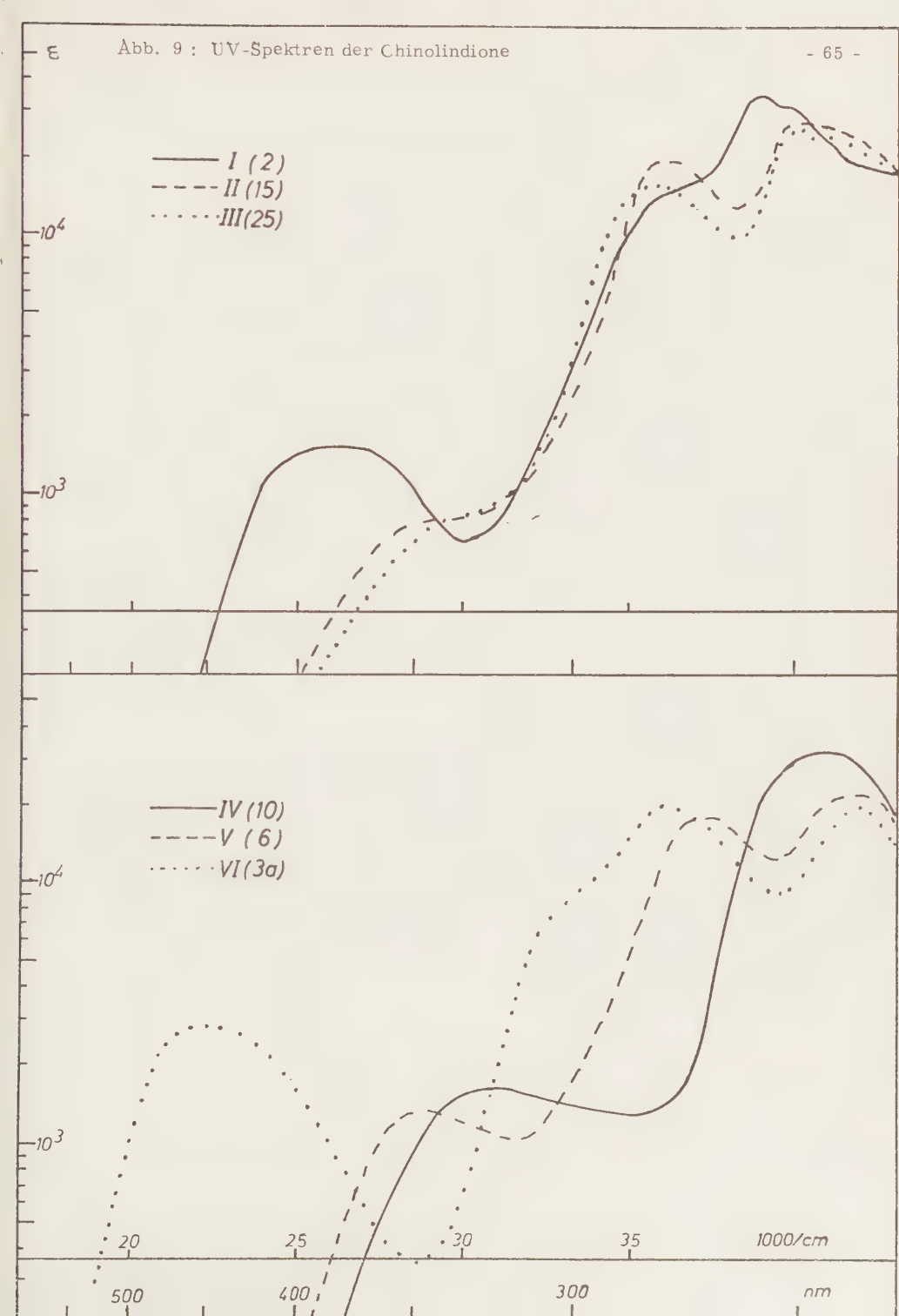
1000/cm

500

400

300

nm



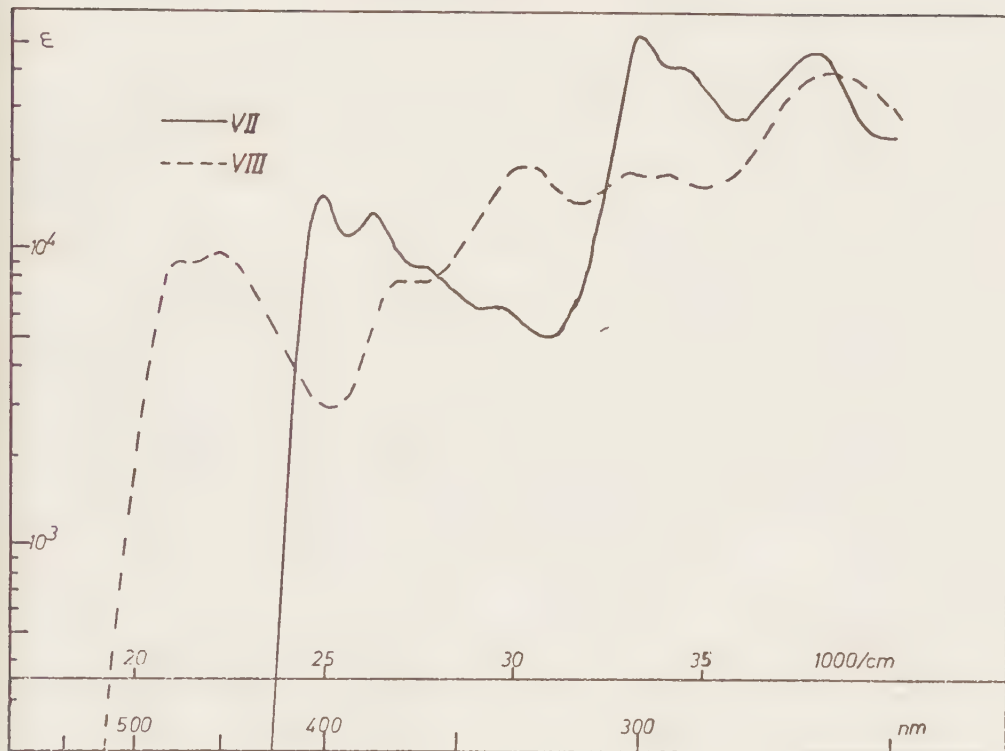
Chinonring eine Rotverschiebung der Banden, und zwar besonders deutlich im kurzwelligen Bereich von 250-300 nm. Die $\tilde{\Pi} \longrightarrow \tilde{\Pi}^*$ -Übergänge des kurzwelligen Bereichs des UV-Spektrums der Verbindung 10 fallen in eine breite Bande bei 246 nm zusammen, während bei den Methoxy-Verbindungen 15 und 25 (Spektrum II und III) eine Trennung in zwei bis drei Banden (Schultern) zum längerwelligeren Bereich hin auftritt.

Der Wegfall der beiden Methylgruppen, unter Beibehaltung der Methoxygruppe bei 6, Spektrum V, ruft eine Blauverschiebung der Banden hervor. Der Ersatz der Methoxygruppe im Chinonring durch eine basisch alkylierte Aminogruppe verursacht eine intensive Rotverschiebung, die besonders auffällig im längerwelligen Bereich ist. So tritt eine breite Bande im Spektrum VI von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (3a) im sichtbaren Bereich bei 449 nm auf, worauf die intensive orangerote Färbung dieser Verbindung zurückzuführen ist.

2.9.2. Pyrido [3.2-a] phenazine

1,3-Dimethyl-5-methoxy-pyrido [3.2-a] phenazin (4a), Spektrum VII, und 5-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-pyrido [3.2-a] phenazin (8), Spektrum VIII, verursachen bandenreiche, komplexe UV-Spektren, wobei die langwelligste Absorptionsbande der basisch alkylierten Amino-Verbindung 8 stark zum sichtbaren Bereich hin verschoben ist. Die hohen ϵ - Werte der Verbindungen 4a (260 nm, $\log \epsilon = 4.56$) und 8 (267 nm, $\log \epsilon = 4.47$) bieten sich für eine quantitative Bestimmung mit Hilfe der UV-Spektroskopie an.

Abb. 10 : UV-Spektren der Pyrido [3.2-a] phenazine



2. 10. Massenspektren

Im experimentellen Teil sind am Ende einer Reihe von Vorschriften Daten der jeweiligen Massenspektren angegeben. Dabei beschränkte ich mich auf die Angabe derjenigen Fragmentierungen, welche zum Strukturbeweis herangezogen werden können.

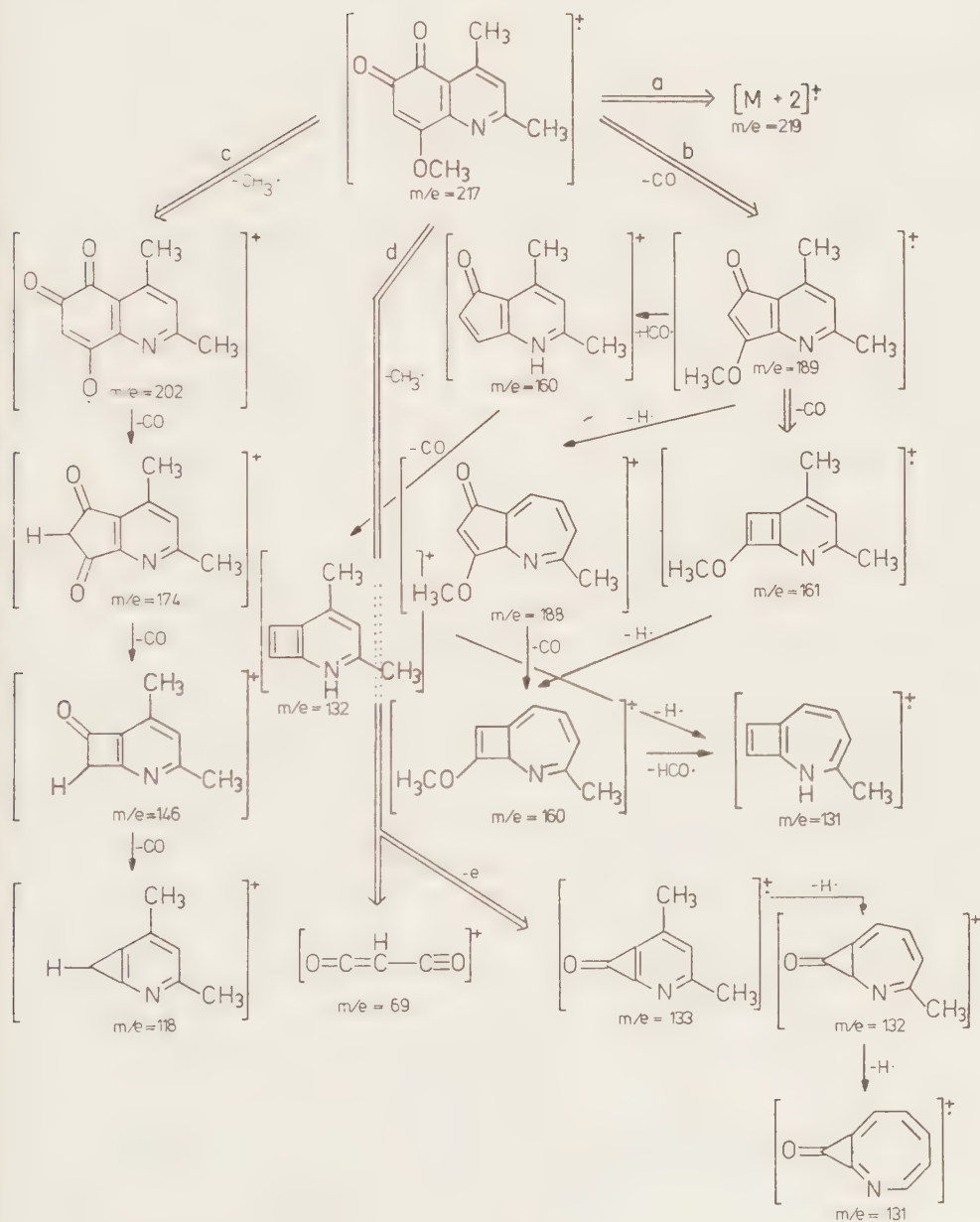
2. 10. 1. Chinolindione

Als strukturbeweisende Bruchstücke im Massenspektrum der Chinone gelten der $[M - CO]^+$, der $[M - 2 CO]^+$ und der $[M + 2]^+$ Peak (Weg a und b im Fraktionierungsschema) ^{132, 52}. Der $[M + 2]^+$ Peak entsteht durch teilweise Reduktion von Chinonen mit hohem Redoxpotential durch Feuchtigkeitsspuren im Einlaßsystem und in der Ionisationskammer ⁵². Er tritt bei o-Chinonen in ausgeprägterer Form auf, da diese ein beträchtlich höheres Redoxpotential besitzen als ihre p-Iso-meren.

Die drei genannten Peaks treten bei 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5.6-chinolindion (2) und bei 6- bzw. 7-Methoxy-2.4-dimethyl-5.8-chinolindion (15 bzw. 25) auf. Bei den beschriebenen basisch alkylierten Amino-chinolindionen ist lediglich bei 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5.6-chinolindion (7) der $[M - CO]^+$ Peak zu finden, wohingegen die CO-Abspaltung bei 6-(Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2.4-dimethyl-5.8-chinolindion (3a) erst nach teilweiser Fragmentierung der Seitenkette eintritt.

Ebenfalls strukturbeweisend für die Verbindungen 2, 15 und 25 ist das Auftreten der Fragmente $m/e = 133, 132, 131$ und 69, welche durch folgenden Zerfall zustande kommen könnten: Fragmentierungsschema 1, Weg d.

FRAGMENTIERUNGSSCHEMA 1



Für die Anwesenheit der Methoxygruppe im chinoiden Ring der Verbindungen 2, 15 und 25 kann die Methylobspaltung von der Methoxygruppe, gefolgt von einer dreifachen, schrittweisen CO-Abspaltung als Beweis herangezogen werden (Weg c).

Erwähnenswert ist die Tatsache, daß von den drei isomeren Verbindungen 2, 15 und 25 alleine 25, 7-Methoxy-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion, einen $[M - 1]^{+}$ -Peak aufweist.

In den Massenspektren von 2, 15 und 25 treten übereinstimmend die metastabilen Ionen $m^{*} = 164.6$ und $m^{*} = 137.1$ auf, die den Zerfällen $m/e\ 217 \xrightarrow{*} m/e\ 169$ und $m/e\ 169 \xrightarrow{*} m/e\ 161$, also den CO-Abspaltungen, zuzuordnen sind.

2.10.2. Pyrido[3,2-a]phenazine

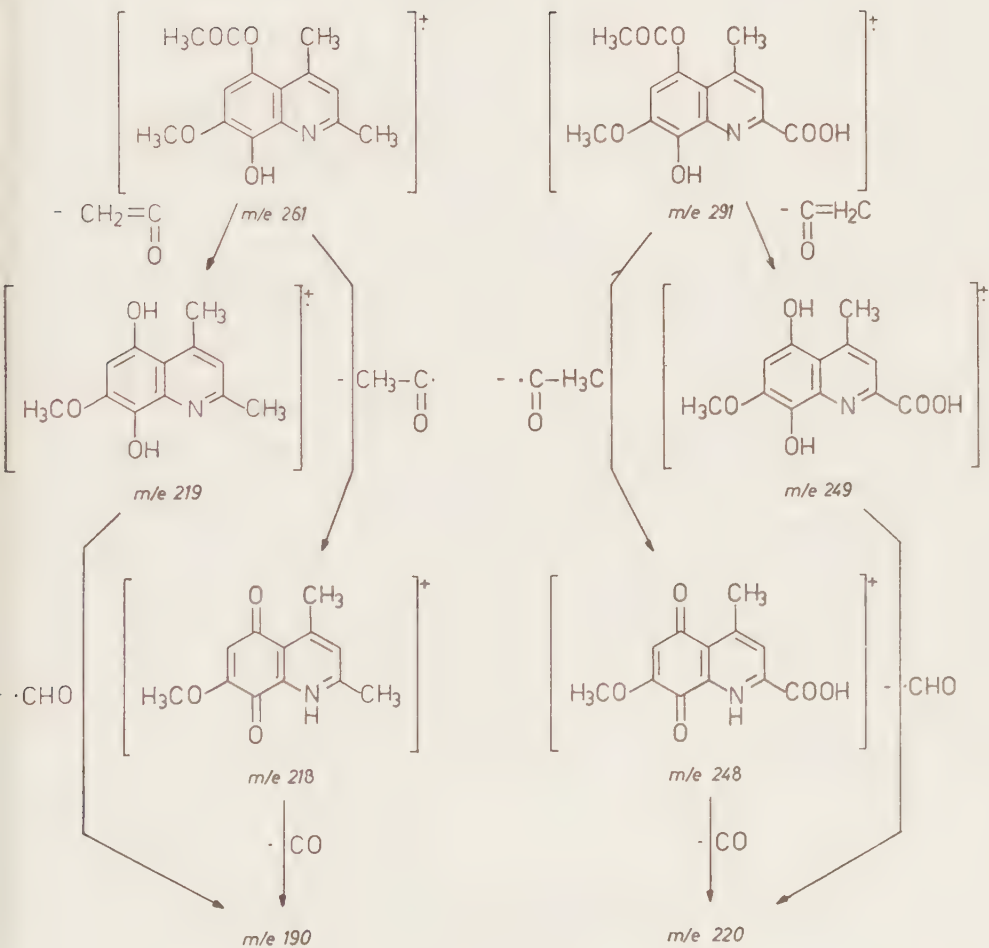
Die Massenspektren der drei Pyrido[3,2-a]phenazine 4a, 4b und 8 (s. Nomenclchema 1) stellen peakarme Spektren dar. Dies beruht auf der Stabilität des kondensierten Ringsystems. Lediglich das Spektrum der basischen alkylierten Verbindung 8 zeigt im unteren Bereich eine starke Fragmentierung, welche von der 4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino-Seitenkette herrührt.

Beweisend für 1,3-Dimethyl-5-methoxy-pyrido[3,2-a]phenazin (4a) dürfte wohl der $[M - 29]^{+}$ -Peak sein, der eine Abspaltung von CHO aus der 5-Methoxygruppe unter Mitwirkung des o-ständigen Ringstickstoffatoms anzeigt.

Für 5-(2-Amino-anilino)-1,3-dimethyl-pyrido[3,2-a]phenazin (4b) kann der $[M - 15]^{+}$ -Peak als Folge einer Abspaltung von NH₂ aus der 5-(2-Amino-anilino)-gruppierung hervorgehen.

Im Massenspektrum von 5-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-pyrido[3,2-a]phenazin (8) tritt ein $[M - 73]^{+}$ -Peak mit der größten relativen Intensität auf. Er entsteht durch Abspaltung von Diäthylamin.

FRAGMENTIERUNGSSCHEMA 2



Zusätzlich gesichert dürften die Verbindungen 4a, 4b und 8 noch durch das Auftreten von doppelt geladenen Molekülonen bei 144.5, 182.5 und 193.5 sein.

2.10.3. Umsetzungsprodukte aus der Behandlung von 5.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (24) mit Acetanhydrid/rauchende Salpetersäure.

Das Massenspektrum, das von der gut kristallisierenden Substanz aus dieser Umsetzung erhalten werden konnte, zeigte zwei Molekülpeaks bei $m/e = 261$ bzw. 291 . Von beiden gehen gut unterscheidbare Fragmentierungen aus. (Fragmentierungsschema 2).

Daß es sich um ein Gemisch aus 5-Acetoxy-8-hydroxy-7-methoxy-2.4-dimethyl-chinolin (26) und der entsprechenden Chinaldinsäure (27) handeln dürfte, geht auch aus dem IR-Spektrum hervor, welches neben einer starken Absorptionsbande bei 1740 cm^{-1} (Phenolacetat) noch mittelschwere Banden im Bereich um 1600 cm^{-1} aufweist, die auf eine Betain-Struktur zwischen dem Chinolinstickstoff und der dazu orthoständigen Carboxyl-Gruppe schließen lassen.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Präparative Versuchsbeschreibungen

1.1. Allgemeine Angaben

Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert, zu ihrer Bestimmung diente ein Kupferblock nach L i n s t r ö m.

Unter Vakuum (i. Vak.) ist das mit der Wasserstrahlpumpe erreichbare Vakuum zu verstehen. Zum Eindampfen i. Vak. wurde ein Büchi-Rota-vapor R verwendet, dessen Wasserbadtemperatur wahlweise 20-90°C betrug.

Unter Äthanol ist, wenn nicht anders angegeben, 96proz. Äthanol, vergällt mit 1 % Petroläther, zu verstehen. Unter Petroläther ist ein bei 40-60°C und unter Ligroin ein bei 90-100°C siedendes Gemisch flüssiger Paraffin-Kohlenwasserstoffe zu verstehen. Als Chloroform wurde Chloroform DAB 7, stabilisiert mit 1 % Äthanol, verwendet. Als Aktivkohle diente Carbo medicinalis DAB 7 (Merck AG).

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Glasplatten mit Kieselgel G (Typ 60) der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet. Die Chromatogramme wurden in luftdicht verschlossenen Glasküvetten entwickelt. Zur Betrachtung im UV-Licht bei 254 oder 360 nm diente das Fluotest-Gerät "Original Hanau" der Quarz-lampen Ges. m.b.H., Hanau. Zum Besprühen wurde eine 0,04proz. wäßrige Lösung von Natrium-Fluoreszein oder Dragendorff's Reagens verwendet. Die Angabe der Steighöhen erfolgte in Form der h_{RF} -Werte = $RF \times 100$ ¹¹⁶⁾.

Die präparative Schichtchromatographie (PSC) erfolgte auf mit Kieselgel 60 PF₂₅₄, Merck AG, Darmstadt, beschichteten, quadratischen Glasplatten von 20 cm Kantenlänge, Schichtdicke 1 mm. Zur Be-

schichtung diente das Uniplan-Beschichtungsgerät Typ L der Firma Shandon Scientific Company Ltd., London. Jeweils sechs Glasplatten wurden mit einer Suspension, bestehend aus 150 g Kieselgel und 310 ml Wasser, bestrichen. Nach 24-stündigem Vortrocknen an der Luft wurden die beschichteten Platten vor Gebrauch eine Stunde bei 120°C aktiviert. Das Auftragen der Substanzgemische (50-500 mg) erfolgte als Band in Form einer Chloroformlösung mit dem TLC-Applicator der Firma ICN Pharmaceuticals GmbH & Co., Eschwege, und einer 1 ml Spritze mit teflonüberzogenen Kanüle der Firma Unimetrics Corporation, Anaheim Kalifornien, unter Stickstoffbegasung. Die Mehrfachentwicklung fand in luftdicht verschlossenen Glasküvetten statt, deren Wände mit Filterpapier ausgekleidet waren. Nach dem Entwickeln wurden die gewünschten Zonen mit einem Spatel noch feucht abgekratzt, und die adsorbierte Substanz in der Regel durch mehrfache Behandlung mit dem jeweiligen Fließmittelgemisch vom Kieselgel gelöst.

Die Säulenchromatographie (SC) erfolgte entweder an neutralem Aluminiumoxid der Firma ICN Pharmaceuticals GmbH & Co., Eschwege, oder an Kieselgel (feiner als 200 mesh ASTM) bzw. Kieselgel 40 (70-230 mesh) der Firma Merck AG, Darmstadt.

Die UV-Absorptionsspektren wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer DMR 21 mit Schreiberautomatik aufgenommen.

Die IR-Spektren wurden in KBr-Preßlingen mit dem Perkin-Elmer IR-Spektralphotometer, Modell 457, von Frl. Dr. G. Volz aufgenommen, wofür ich mich an dieser Stelle bedanken möchte. Für die verständnisvolle Hilfe bei der Interpretation danke ich Herrn Dr. A. Haag, Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg.

Für die mit dem CH 4-Gerät der Firma Varian-Atlas erhaltenen Massenspektren und deren verständnisvollen Diskussion danke ich ebenfalls Herrn Dr. A. Haag, Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg.

Für das mit dem 60 Mhz-Gerät der Firma Jeol, Tokio, erhaltene ¹H-NMR-Spektrum und dessen verständnisvollen Diskussion danke ich Herrn Univ.-Doz. Dr. K. Geibel, Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg.

Die angegebenen Elementaranalysen wurden im Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg ausgeführt.

Die wasserfreien Titrationen wurden mit 0.1 N Perchlorsäure in Dioxan mit dem Titrigraph, bestehend aus Titrator TTT 60, pH-Meter PHM 64, Autobürette ABU 13 und Schreiber REC 61 Servograph der Firma Radiometer, Kopenhagen, durchgeführt. Als Elektroden dienten die Radiometer-Glaselektrode G 202 b und die Radiometer-Kalomelektrode K 401. Als Lösungsmittel benutzte man wasserfreien Eisessig oder Essigsäureanhydrid. Die Titereinstellung der 0.1 N Perchlorsäure erfolgte gegen Kaliumhydrogenphthalat p. a. in wasserfreiem Eisessig.

Analysenproben wurden, wenn nicht anders angegeben, 48 Stunden i. Vak. über P₂O₅ getrocknet.

Die pH-Werte der Oxidationsansätze mit Kaliumhexacyano-ferrat(III) wurden mit dem pH-Meter 28 der Firma Radiometer, Kopenhagen, und der Radiometer-Einstabelektrode GK 2321 C eingestellt und verfolgt.

1.2. 5,6- und 5,8- Chinolindione

8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) ⁸¹⁾

9.9 g (15 mmol) 6-(4-Dimethyl-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin-naphthalin-1,5-disulfonat (1a) wurden unter Erwärmen in 90 ml Wasser gelöst. Mit 2 N NaOH wurde ein pH-Wert von 6,8 eingestellt. Unter Rühren wurde eine Lösung von 19.8 g (60 mmol) Kaliumhexacyanoferrat III in 100 ml Wasser milliliterweise zugegeben. Der pH-Wert wurde mit einer Einstabelelektrode überwacht und durch adäquates Zutropfen von 2 N NaOH im Intervall von 6,8 - 7,0 gehalten. Die Lösung veränderte sich tiefrot. Nach beendeter Zugabe ließ man noch so lange rühren bis kein pH-Abfall mehr zu beobachten war. Nach ca. 10 Minuten stieg der pH-Wert an, und ein gelber, amorpher Niederschlag setzte sich ab. Mit 2 N HCl wurde der pH um den Neutralpunkt gehalten, und nach einer halben Stunde wurde der Niederschlag auf einer Fritte gesammelt, mit wenig Wasser gewaschen und i. Vak. über P_2O_5 getrocknet. Die Mutterlauge wurde dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert und der Extrakt i. Vak. eingedampft. Der Rückstand, orangefelbes, kristallines Pulver, wurde gemeinsam mit dem getrockneten Niederschlag aus Toluol umgelöst. Man erhielt 2.3 g (70.7 % d.Th.) goldgelbe Kristalle, welche bei 200-203°C unter Zersetzung schmolzen.

13.60 mg Substanz (in Eisessig)

0.625 ml 0.1 N $HClO_4$

$C_{12}H_{11}NO_3$ (217,23)

Ber.: Äquiv.-Masse: 217,2

Gef.: Äquiv.-Masse: 217,6

UV (Chloroform): λ_{max} (log ϵ) = 251 (sh), 257 (4,53), 272 (sh),
385 nm (3,15); s. Abb.9

IR (KBr): 1688 (C=O), 1654 cm^{-1} (C=O); s. Abb.8

MS (70 eV): m/e = 217 (M^+), 219 ($M+2$), 202 ($M-CH_3$), 189 ($M-CO$)
161 ($M-2CO$), 133, 132, 131, 69.

6-Methoxy-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (15) ⁸¹⁾

a) aus 6-Chlor-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (11) ⁸¹⁾:

10 g (45.1 mmol) 6-Chlor-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (11), das durch Addition von HCl an 2,4-Dimethyl-5,8-chinolindion (10) und anschließender Kaliumdichromatoxidation gewonnen wurde, wurden in einem 500 ml Dreihalskolben, mit Tropftrichter und Kühler, in 250 ml abs. Methanol unter Rühren in der Siedehitze gelöst. Unter ständigem Rühren wurde eine NaOCH_3 -Lösung, welche 25 mmol ⁺⁾ NaOCH_3 enthielt, innerhalb 1 - 1 1/2 Stunden zugetropft, wobei sich die erst hellgelbe Lösung bis dunkelrot-schwarz verfärbte. Nach beendeter Zugabe fiel ein ockerfarbener Niederschlag aus. Er wurde abgesaugt und bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurden 5.8 g (59.2 % d.Th.) gewonnen. Eine aus Toluol umgelöste Probe zersetzte sich bei 229-231°C. Im Dünnschichtchromatogramm mit Chloroform als Fließmittel war ein gelber Fleck mit hR_F 20 zu sehen, mit Aceton als Fließmittel ein rötlicher Fleck mit hR_F 70.

b) aus 8-Amino-6-methoxy-2,4-dimethyl-chinolin (12):

10.1 g (50 mmol) 8-Amino-6-methoxy-2,4-dimethyl-chinolin (12), das durch Ringschluß von 4-Amino-3-nitro-anisol mit Äthylidenaceton und anschließender katalytischen Reduktion hergestellt wurde ^{55a, 125)}, wurden in 50 ml Acetapuffer gelöst. Unter Eiskühlung und Rühren wurde bei 5-10°C eine äquivalente Menge diazotierte Sulfanilsäure nach und nach eingetragen. Es fiel amorphes ziegelrotes Kupplungsprodukt 13 aus. Nach scharfem Absaugen wurde die noch feuchte Azoverbindung unter Erwärmen in 100 ml 10-proz. Ammoniak gelöst und die abgekühlte Lösung

+) Herr stud.pharm. Rudolf Reichardt hat im Rahmen des Literaturpräparates festgestellt, daß unter den angegebenen Temperatur- und Zeitbedingungen bei Zugabe von ca. der halben äquivalenten Menge an NaOCH_3 die besten Ausbeuten zu erzielen waren. Eine Zugabe der äquivalenten Menge lieferte einen tiefschwarzen Niederschlag, aus dem das gewünschte Produkt nicht zu isolieren war.

mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ bis zur Sättigung versetzt. Unter dreistündigem Rühren entfärbte sich der Ansatz nach hellrot. Nach Zugabe von konz. Ammoniak bis pH 10 fiel rotbraunes, kristallines 5,8-Diamino-6-methoxy-2,4-dimethylchinolin (14) aus, welches abgesaugt und mit Wasser gewaschen wurde. Ohne zu trocknen, wurde das Rohprodukt in einer Mischung aus 5 ml 12 N H_2SO_4 und 225 ml Wasser gelöst und die Lösung mit ca. 100 g zerstößtem Eis in einen 2 l Scheidetrichter überführt. Unter heftigem Rühren wurden innerhalb 2 Minuten aufeinanderfolgend zugesetzt: 1) eine Mischung aus 25 ml 10 proz. wäßrige Kaliumdichromatlösung und 20 ml 12 N H_2SO_4 , 2) 95 ml 10 proz. wäßrige Kaliumdichromatlösung und 10 ml 12 N H_2SO_4 , 3) 200 ml Chloroform. Nach zehnmünütiger Reaktionszeit wurde die organische Phase durch weitere 200 ml Chloroform ersetzt. Nach insgesamt 20 und 40 Minuten wurde durch je 100 ml frisches Chloroform erneuert. Die gesamte Reaktionszeit betrug 60 Minuten. Währenddessen wurde darauf geachtet, daß immer Eis im Ansatz vorhanden war. Die vereinigten Chloroformphasen wurden zweimal mit je 100 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet. Es wurde i. Vak. auf ca. 100-150 ml eingengt, 10 Minuten mit zwei Spatelspitzen Aktivkohle gerührt, filtriert und das Filtrat weiter bis zur beginnenden Kristallisation i. Vak. eingedampft. Mit einer größeren Menge Petroläther wurde vollends ausgefällt. Man erhielt nach dem Trocknen 1.5 g grüngelbe Kristalle. Die wäßrige Phase des Oxidationsansatzes wurde vorsichtig mit konz. Ammoniak auf pH 6.5 - 7.0 gebracht und mit 200 ml Chloroform ausgeschüttelt. Dieser Chloroformextrakt wurde auf die gleiche Weise aufgearbeitet und weitere 1.3 g grüngelbe, kristalline Substanz wurde gewonnen. Gesamtausbeute: 2.8 g (25.8 % d. Th., bezogen auf 8-Amino-6-methoxy-2,4-dimethylchinolin). Eine aus Toluol umgelöste Probe schmolz unter Zersetzung bei 228-230°C. Im Dünnschichtchromatogramm mit Chloroform als Fließmittel war ein gelber Fleck mit hR_F 20 zu sehen, mit Aceton als Fließmittel ein rötlicher Fleck mit hR_F 70.

Die Substanz stimmte im Schmelz- und dünnenschichtchromatographischen Verhalten mit der nach a) erhaltenen überein.

13.03 mg Substanz (in Acetanhydrid) 0.595 ml 0.1 N HClO_4

$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3$	(217.23)	Ber.:	Äquiv.-Masse:	217.2
		Gef.:	Äquiv.-Masse:	219.0

UV (Chloroform): λ_{max} (log ϵ): 247 (sh), 249 (4.44), 278 (4.27),
333 nm (sh); s. Abb. 9

IR (KBr): 1674 cm^{-1} (C=O); s. Abb. 8

MS (70 eV): $m/e = 216 (\text{M}^+)$, 219 (M+2), 202 (M- CH_3), 189 (M-CO),
161 (M-2CO), 133, 132, 131, 69

7-Methoxy-2.4-dimethyl-5.8-chinolindion (25)

Zu 0.5 g (2.5 mmol) 5.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (24) wurden unter heftigem Rühren bei -15°C 0.6 ml 40-proz. HNO_3 (eisgekühlt) zugetropft. Es bildete sich eine intensiv gelb gefärbte Paste. Bei langsam ansteigender Temperatur ließ man zwei Stunden rühren, wobei eine hellbraune Lösung entstand. Unter Rühren wurde auf 20 ml Eiswasser gegossen, mit konz. Ammoniak tropfenweise bis pH 8 versetzt und einmal mit 20 ml Chloroform extrahiert. Die braune Chloroformphase wurde mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und i. Vak. eingedampft. Man erhielt ein dunkelbraunes, kristallines Produkt. Eine Lösung in 10 ml Chloroform wurde über eine Säule Kieselgel 40 MERCK (70-230 mesh, $l=6 \text{ cm}$, $\varnothing = 1 \text{ cm}$) mit 100 ml Chloroform chromatographiert. Die ersten 50 ml gelb gefärbtes Eluat wurden i. Vak. eingedampft, und man gewann 210 mg (47.8 % d. Th.) gelbes, kristallines Pulver. Umlösen aus 10 ml Toluol erbrachte 165 mg rein gelbe Kristallnadeln, welche bei $207-209^\circ\text{C}$ unter Zersetzung schmolzen. Im Dünnschichtchromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Diäthylamin (9+1) zeigte sich ein roter Fleck bei R_F 34. Eine schwefelsaure Kaliumjodidlösung wurde oxidiert.

12.98 mg Substanz (in Eisessig)

0.593 ml 0.1 N HClO_4

$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ (217.23)

Ber.: Äquiv.-Masse: 217.2

Gef.: Äquiv.-Masse: 218.9

UV (Chloroform): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 244 (sh), 251 (4.37), 279 (4.18),
335 nm (sh); s. Abb. 9

IR (KBr): 1689 cm^{-1} (C=O); s. Abb. 8

MS (70eV): m/e = 217 (M^+), 219 (M+2), 202 (M- CH_3), 189 (M-CO),
161 (M-2CO), 133, 132, 131, 69

8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-chinolindion (7) ³⁹⁾ +)

a) Oxidation von 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-dimethoxy-chinolin (5) mit Kaliumhexacyanoferrat(III) im Alkalischen:

0.63 g (1 mmol) 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-dimethoxy-chinolin-naphthalin-1,5-disulfonat (5) wurden in 10 ml Wasser gelöst. Mit einer Einstabelektrode wurde der pH-Wert der Lösung überwacht. Mit 0.5 N NaOH wurde der pH-Wert auf 8.5 eingestellt. Eine Lösung von 1.0 g (3.04 mmol) Kaliumhexacyanoferrat (III) in 10 ml Wasser wurde langsam aus einer Bürette unter Rühren zugetropft, wobei der pH-Wert 8.5 durch adäquate Zugabe von 0.5 N NaOH konstant gehalten wurde. Nach beendeter Zugabe wurde noch eine Stunde weitergerührt. Die rote Lösung wurde dreimal mit je 30 ml Chloroform ausgeschüttelt, die vereinigten Extrakte über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft. Man erhielt ein rotes, schmieriges Produkt. Im Dünnschichtchromatogramm, mit Benzol/Diäthylamin (9+1) als Fließmittel, war als Hauptfleck ein roter Fleck mit hR_F .31 zu erkennen. Nach vergleichender DC handelte es sich um 6-Methoxy-5,8-chinolindion (6).

+) Das 5,6-Chinolindion 7 ist in der Literatur erwähnt ³⁹⁾.
Eine chemische Synthese ist jedoch nicht beschrieben.

b) Oxidation von 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-dimethoxy-chinolin (5) mit Kaliumhexacyanoferrat (III) im Sauern:

3,9 g (6,15 mmol) 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-dimethoxy-chinolin-naphthalin-1,5-disulfonat (5) wurden in 50 ml Wasser gelöst. Zur Überwachung des pH-Wertes tauchte eine Einstabelektrode in die Lösung. Mit 0,5 N NaOH wurde der pH-Wert auf 5,0 eingestellt. Unter Rühren ließ man eine Lösung von 16,5 g (50,1 mmol) Kaliumhexacyanoferrat (III) in 50 ml Wasser aus einer Bürette langsam zutropfen. Durch gleichzeitige Zugabe von 0,5 N NaOH wurde der pH-Wert im Intervall zwischen 4,8 und 5,0 gehalten. Es wurde fünf Stunden nachgerührt. Mit 1 N NaOH wurde der Ansatz auf pH 12 gebracht und sofort zweimal mit je 100 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten, roten Chloroform-extrakte wurden über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet, zehn Minuten mit Aktivkohle gerührt, filtriert und das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen. Es wurden 1,7 g rotes Öl gewonnen. Zur weiteren Reinigung wurde es in 5 ml Chloroform gelöst und auf fünf Dickschichtplatten aufgetragen. Es wurde zweimal mit Benzol/Diäthylamin (9+1) entwickelt. Es zeigten sich sechs Banden, wovon eine breite, orangefarbene Bande mit hR_F 66 als gewünschtes Produkt angesehen wurde. Sie wurde noch feucht abgehoben, unter Rühren mit dem Fließmittel eluiert und das Eluat nach dem Filtrieren i. Vak. eingedampft. Der ölige Rückstand wurde zur Entfernung von evtl. gelöstem Adsorptionsmittel in 50 ml absol. Äther aufgenommen, filtriert und erneut i. Vak. eingedampft. Es wurden 1,1 g (56,7 % d.Th.) klares, rotes Öl gewonnen. Das Massenspektrum zeigte einen Molekülpeak m/e von 315. Ein Peak größerer Intensität lag bei m/e = 396. Da das rote Öl sich rasch, in wenigen Stunden, in ein dunkel-rotbraunes Harz verwandelt, wurde mit o-Phenylendiamin in Eisessig zu öligem 5-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-pyrido [3,2-a] phenazin (8) umgesetzt.

UV (Chloroform): $\lambda_{\max}$ ($\log \epsilon$) = 238 (4.13), 272 (3.92), 294 (3.84),
357 (3.38), 441 nm (3.33)

IR (KBr): 3500 (-NH-), 1700 cm^{-1} (C=O)

MS (70 eV) : m/e = 315 (M^+), 396, 287 (M-CO)

6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (3a)

a) aus 6-Methoxy-2,4-dimethyl-chinolindion (15):

5.0 g (23 mmol) 6-Methoxy-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (15) wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben in 50 ml Methanol suspendiert. 4.0 ml (d = 0.814 , 20.5 mmol) 4-Diäthylamino-1-amino-pentan wurden unter Rühren zugegeben. Es wurde bei Zimmertemperatur fünf Tage gerührt. Ausgangsprodukt war nach dieser Zeit dünnsschichtchromatographisch nicht mehr nachweisbar. Die schwarzbraune Lösung wurde i. Vak. eingedampft. Der teerige, schwarze Rückstand wurde in Chloroform gelöst und über eine Säule Al_2O_3 , neutral (l = 20 cm, ϕ = 2 cm), mit Chloroform filtriert. Das Eluat wurde i. Vak. eingeeengt, und die Filtration über Al_2O_3 -Säulen zweimal wiederholt. Nach dem Eindampfen erhielt man 2.2 g klares, rotes Öl. Es wurde in 3 ml Chloroform gelöst und mit dem TLC-Applicator auf fünf Kieselgel-Dickschichtplatten aufgetragen. Nach dreimaligem Entwickeln mit Benzol/Diäthylamin (9+1) als Fließmittel wurden die orangefarbenen Banden noch feucht abgehoben, und es wurde mit insgesamt 200 ml Fließmittelgemisch unter Rühren vom Kieselgel extrahiert. Der orangerote Extrakt wurde i. Vak. eingedampft, das zurückbleibende rote Öl unter Erwärmen in 150 ml Ligroin gelöst und die Lösung in einer Trockeneis /Aceton-Mischung rasch abgekühlt. Dabei fiel ein oranges, amorphes Pulver aus. Ausbeute: 1.2 g (17 % d. Th.). Das Produkt zeigte nach längerem Trocknen i. Vak. über Paraffin einen Schmelzpunkt von 46-47 $^{\circ}\text{C}$. Im Dünnsschichtchromatogramm mit Benzol/Diäthyl-

amin (9+1) als Fließmittel zeigte sich ein oranger Fleck bei hR_F 33, mit Benzol/Triäthylamin (9+1) bei hR_F 23.

12.06 mg Substanz (in Eisessig) 0.692 ml 0.1 N $HClO_4$

$C_{20}H_{29}N_3O_2$ (343.47)

Ber.: Äquiv.-Masse: 171.7

Gef.: Äquiv.-Masse: 174.3

Ber.: C 69.94 H 8.51 N 12.23

Gef.: C 67.14 H 8.27 N 11.85

Mol.-Masse: 343 (osmometrisch in Chloroform)

UV (Chloroform): $\lambda_{max}(\log \epsilon)$: 240 (4.26), 274 (sh), 279 (4.26),
294 (sh), 449 nm (3.44)[✓]

IR (KBr): 3375 (-NH-), 1670 cm^{-1} (C=O)

MS (70eV): m/e = 343 (M^+), 345 (M+2), 328 (M-CO), 272, 271, 270,
257, 229

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 1.01 (t, J=7.1 Hz, CH_3 ; N-Äthyl), 1.26 (d, J=6.8 Hz, CH_3 -CH-), 1.53-1.63 (m, - CH_2 - CH_2 -), 2.50 (q, J= 6.9 Hz, =N- CH_2 -; N-Äthyl), 2.67 (s, CH_3 -Ar), 5.94 (s, H-C-CO-), 7.06 ppm (s, H-C=C-)

b) aus 2.4-Dimethyl-5.8-chinolindion (10):

3.74 g (20 mmol) 2.4-Dimethyl-5.8-chinolindion (10), das aus 5.8-Dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (9) durch Ätherspaltung mit Bromwasserstoff und anschließender Dichromatoxidation gewonnen wurde, 3.16 g (20 mmol) 4-Diäthylamino-1-amino-pentan und 0.74 g $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ (2 mmol) wurden in 200 ml absol. Äthanol unter Luftzutritt 72 Stunden heftig gerührt. Dabei verfärbte sich der Ansatz dunkel. Es wurde i. Vak. eingedampft, der teerige Rückstand in 500 ml Wasser gelöst, mit 2 ml Eisessig versetzt und durch Zugabe von festem Natriumacetat auf pH 7.0 abgepuffert. Mit je 250 ml Chloroform wurde fünfmal extrahiert. Nach dem Trocknen mit wasserfreiem Na_2SO_4 und anschließendem Eindampfen i. Vak. wurde ein schwarzes, teeriges Produkt erhalten. Es wurde in 50 ml Chlo-

roform gelöst und dreimal über Al_2O_3 , neutral ($l = 25 \text{ cm}$, $\phi = 4 \text{ cm}$),
filtriert. Nach dem Abziehen des Chloroforms erhielt man ein dunkelrotes,
schmieriges Produkt. Es wurde in 50 ml Chloroform/Methanol (99+1)
gelöst und über eine Säule Kieselgel Merck (200 g, feiner als 200 mesh
ASTM) chromatographiert. Eluiert wurde mit insgesamt 1.3 l Chloro-
form/Methanol (99+1). Die zunächst gelben Eluate wurden verworfen, die
folgenden orangegefärbten vereinigt, i. Vak. einrotiert und das erhaltene
rote Öl erneut der Säulenchromatographie unterworfen (150 g Kieselgel
Merck, feiner als 200 mesh ASTM, Elutionsmittel: Chloroform/Methanol
(95+5)). Die nach DC einheitlichen orangegefärbten Eluate wurden i. Vak.
eingedampft. Man erhielt 4.1 g (59.7 % d. Th.) rotes Öl, das nach mehr-
wöchigem Stehen bei $+4^\circ\text{C}$ zu einer öligen Kristallmasse erstarrte.
Im Dünnschichtchromatogramm erwies sich die Substanz als identisch mit
nach der Methode a) hergestelltem 3a.

Oxidation von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-
2,4-dimethyl-chinolin (1a) bzw. 6-N-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl)-
N-äthylamino-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (1b) mit AgO .

In einem 10 ml Erlenmeyerkölbchen wurden 74.7 mg (0.2 mmol)
6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-
chinolin (1a) in 2 ml Dioxan gelöst und 100 mg (0.8 mmol) AgO zu-
gefügt. Daneben wurde der entsprechende Ansatz mit 80.3 mg (0.2 mmol)
6-N-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl)-N-äthylamino-5,8-dimethoxy-2,4-
dimethyl-chinolin (1b) durchgeführt. Nach Dispergieren in einem Ultra-
schallbad wurden jeweils 0.2 ml 6 N HNO_3 zugegeben und beschallt.
Nach fünf Minuten war die Reaktion abgelaufen, erkennbar an einer Klärung
zu einer roten Lösung. Mit je 5 ml Chloroform wurde ausgeschüttelt. Man
erhielt gelbgefärbte Extrakte. Anschließend wurde zu den sauren, wäßri-
gen Phasen je 0.2 ml 6 N NaOH zupipettiert, vom ausfallenden Silber-
oxid abfiltriert und wiederum mit je 5 ml Chloroform extrahiert. Man

erhielt rotgefärbte Chloroformauszüge. Mit vergleichender Dünnschichtchromatographie wurde in den gelbgefärbten Extrakten beider Ansätze 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) nachgewiesen (Fließmittel: Benzol/Triäthylamin (9+1), $hR_F = 47$; Benzol/Diäthylamin (9+1), $hR_F = 35$). In den rotgefärbten Chloroformauszügen waren 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (3a) (Fließmittel: Benzol/Triäthylamin (9+1), $hR_F = 21$; Benzol/Diäthylamin (9+1), $hR_F = 39$), bzw. 6-N-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl)-N-äthylamino-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (3b) (Fließmittel: Benzol/Triäthylamin (9+1), $hR_F = 18$; Benzol/Diäthylamin (9+1), $hR_F = 33$) nachzuweisen. Ausgangs- bzw. andere Nebenprodukte waren erstaunlicherweise nicht zu erkennen.

Oxidation von 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-dimethoxy-chinolin (5) mit AgO

In einem 10 ml Erlenmeyerkölbchen wurden 69 mg (0,2 mmol) 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-dimethoxy-chinolin (5) in 2 ml Dioxan gelöst und 100 mg AgO zugefügt. Nach Dispergieren im Ultraschallbad wurden 0,2 ml 6 N HNO_3 zugegeben und fünf Minuten beschallt. Die entstehende klare, orangefarbene Lösung wurde mit 5 ml Chloroform extrahiert. Im Dünnschichtchromatogramm des eingedampften Extraktes mit Benzol/Diäthylamin (9+1) konnte das erwartete 6-Methoxy-5,8-chinolindion (6) nicht nachgewiesen werden. Die verbliebene wäßrige, saure Phase wurde mit konz. Ammoniak bis pH 9,0 versetzt und erneut mit 5 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die erhaltene rote Chloroformlösung wurde i. Vak. eingeeengt. Man erhielt ein braunrotes Öl. Mittels vergleichender Dünnschichtchromatographie konnte als Hauptprodukt 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-chinolindion (7) neben wenig 6-Methoxy-5,8-chinolindion (6) nachgewiesen werden. Eine Reihe von tiefgefärbten Nebenprodukten zeigte die Unbeständigkeit des o-Chinons. Durch Um-

setzung des braunroten Öls mit o-Phenylendiamin in 1 ml Eisessig erhielt man öliges, in Lösung grüngelb fluoreszierendes 5-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-pyrido [3,2-a] phenazin (8).

1. 3. Pyrido [3.2-a] phenazine

Umsetzungen von 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) mit o-Phenylendiamin

a) in Äthanol zur Darstellung von 1.3-Dimethyl-5-methoxy-
pyrido [3.2-a] phenazin (4a):

217.2 mg (1 mmol) 8-Methoxy-2.4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) wurden in 40 ml absol. Äthanol, und 120 mg (1.1 mmol) o-Phenylendiamin wurden in 15 ml absol. Äthanol unter Erwärmen gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt und anschließend 20 min unter Rückfluß gekocht. Die Farbe des Ansatzes wechselte dabei von gelb nach tiefrot. Nach dem Erkalten wurde das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen. Man erhielt ein amorphes, schmutzigrotes Pulver, welches im Dünnschichtchromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Diäthylamin (9+1) drei, etwa gleichstarke Flecken zeigte. Das Rohprodukt wurde in 50 ml Cyclohexan aufgenommen, die Lösung 20 min gekocht, und es wurde noch heiß vom Ungelösten abfiltriert. Über Nacht fiel ein schwach rötliches Pulver aus, welches in Benzol gelöst und auf eine Säule mit Al_2O_3 , neutral (l=5 cm, ϕ =1 cm), gegeben wurde. Eluiert wurde mit 50 ml Benzol. Das gelbe Eluat wurde i. Vak. eingedampft. Es wurden 102 mg (35.3 % d. Th.) gelbes, kristallines Pulver gewonnen. Aus 10 ml Cyclohexan/Benzol (7+3) wurde umgelöst und man erhielt 81 mg feinnadelige Kristalle vom Schmelzpunkt $205-207^{\circ}C$. Zur weiteren Reinigung wurde die Substanz in 2 ml Chloroform gelöst und auf zwei Dickschichtplatten aufgetragen. Zweimal wurde mit Benzol/Chloroform/Diäthylamin (8+2+1) entwickelt. Die gelbe, im UV grün fluoreszierende Zone mit $hR_F \approx 65$ wurde noch feucht abgehoben, mit Chloroform wurde unter Rühren vom Adsorptionsmittel eluiert und nach dem Filtrieren i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde aus Cyclohexan/Benzol (7+3) umgelöst. Man erhielt 66.5 mg reingelbe, filzige Kristallnadeln vom Schmelzpunkt $210-211^{\circ}C$.

10.02 mg Substanz (in Eisessig)

0.345 ml 0.1 N HClO_4

$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}$ (289.34)

Ber.: Äquiv.-Masse: 289.3

Gef.: Äquiv.-Masse: 290.4

Ber.: C 74.72 H 5.26 N 14.52

Gef.: C 74.52 H 5.22 N 14.47

IR (KBr): 2938, 1625, 1600, 1583, 1220 ($-\text{OCH}_3$), 1046 ($-\text{OCH}_3$), 752 cm^{-1}

UV (Chloroform): λ_{max} ($\log \epsilon$) = 260 (4.56), 293 (sh), 301 (4.66),
339 (sh), 365 (sh), 382 (4.09), 403 nm (4.14); s. Abb. 10

MS (70 eV): m/e = 289 (M^+), 288 ($\text{M}-\text{H}$), 260 ($\text{M}-\text{CHO}$).

b) in Eisessig zur Darstellung von 5-(2-Amino-anilino)-1,3-dimethylpyrido [3,2-a] phenazin (4b):

Eine Lösung von 54 mg (0.25 mmol) 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) und 130 mg (1.2 mmol) o-Phenylendiamin in 10 ml Eisessig wurde im Wasserbad kurzzeitig auf 90°C erhitzt, wobei eine tiefrote Lösung entstand. Nach zwölfstündigem Stehen wurde konz. Ammoniak tropfenweise bis pH 9.0 zugegeben und sofort zweimal mit je 25 ml Chloroform extrahiert. Die mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrockneten Chloroformphasen wurden i. Vak. eingedampft; zurückgebliebener Eisessig wurde mit Stickstoff weggeblasen. Man erhielt einen rotbraunen, festen Rückstand. Er wurde in Benzol gelöst und über eine Säule Al_2O_3 , neutral (1 = 20 cm, ϕ = 1 cm), filtriert. Das zuerst erscheinende Eluat war tiefrot gefärbt. Es wurde i. Vak. eingedampft und man erhielt 29.5 mg (32.5 % d. Th. bez. auf 2) dunkelrotes, amorphes Pulver (4b) vom Schmelzpunkt $259-261^\circ\text{C}$. Im Dünnschichtchromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Diäthylamin zeigte sich ein orange-gefärbter Fleck mit hR_F = 77.

$\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_5$ (365.45)

IR (KBr): 3445 und 3350 ($-\text{NH}_2$, = NH), 3290, 2920, 1580, 1507, 1491,
 747 cm^{-1}

MS (70 eV): m/e = 365 (M^+), 364 ($\text{M}-\text{H}$), 350 ($\text{M}-\text{NH}$), 182.5 (M^{++})

5-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-pyrido [3, 2-a] phenazin (8)⁶⁰⁾

1.7 g (5.4 mmol) 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-chinolin-dion (7) und 1.5 g (13.9 mmol) o-Phenylendiamin wurden in 30 ml Eisessig gelöst. Im Wasserbad wurde 5 min auf 90°C erwärmt, dann über Nacht stehengelassen. Der Ansatz wurde mit 25 proz. NaOH auf pH 10.0 gebracht und dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformextrakte wurden eine halbe Stunde mit wasserfreiem Na₂SO₄ und einer Spatelspitze Aktivkohle gerührt, filtriert, und das Chloroform i. Vak. abgezogen. Man erhielt ein schmutzigrotes Öl. Es wurde in 20 ml Benzol gelöst und die Lösung mit Benzol über eine Säule Al₂O₃, neutral (l = 20 cm, ϕ = 1 cm), chromatographiert. Die stark grün fluoreszierenden Eluate, welche nach DC das Phenazinderivat enthielten, wurden vereinigt und i. Vak. eingedampft. Der Rückstand, 1.6 g rotes Öl, wurde in 4 ml Chloroform gelöst und die Lösung auf fünf Dickschichtplatten aufgetragen. Es wurde zweimal mit Benzol/Triäthylamin (9+1) entwickelt. Eine breite, orange Bande mit hR_F = 62 wurde noch feucht mit einem Spatel abgehoben, mit dem Fließmittelgemisch unter Rühren eluiert, filtriert und das Lösungsmittelgemisch i. Vak. abgezogen. Man erhielt ein orangerotes Öl. Da sich bei der gaschromatographischen Untersuchung neben dem Hauptpeak noch drei kleinere Peaks zeigten, wurde erneut mittels Dickschichtchromatographie gereinigt. Dazu wurde das Öl in 3 ml Chloroform gelöst, auf vier Dickschichtplatten aufgetragen und es wurde dreimal mit Chloroform/Methanol (8+2) entwickelt. Es trennten sich ober- und unterhalb der Hauptbande noch deutlich drei weitere schmale Banden ab. Nach Abkratzen, Elution mit Benzol/Triäthylamin (9+1) und Abziehen des Lösungsmittelgemisches i. Vak. wurden 0.9 g (43.1 % d. Th.) klares, orangerotes Öl erhalten, dessen Lösungen intensiv grüngelb fluoreszierten. Im Dünnschichtchromatogramm mit Benzol/Diäthylamin (9+1) als Fließmittel zeigte sich ein gelber, im UV stark grüngelb fluoreszierender Fleck mit hR_F = 72.

5.08 mg Substanz (in Acetanhydrid)

1. Umschlagspunkt: 0.127 ml 0.1 N HClO_4

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_5$ (387.53)

Ber. : Äquiv.-Masse: 387.5

Gef. : Äquiv.-Masse: 400.0

2. Umschlagspunkt: 0.258 ml 0.1 N HClO_4

Ber. : Äquiv.-Masse: 193.8

Gef. : Äquiv.-Masse: 196.9

IR (KBr): 3370 (=NH), 3050, 2980, 1620, 1598, 1582, 1510, 755

UV (Chloroform): λ_{max} (log ϵ) = 267.4 (4.57), 297 (sh), 306 (4.27),
332.2 (4.30), 372 (sh), 457 (3.99), 481 nm (sh), s. Abb. 10

MS (70 eV): m/e = 387 (M^+), 316, 315, 314 ($\text{M}-\text{HNEt}_2$), 273

5-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-pyrido [3.2-a] phenazin-
naphthalin-1.5-disulfonat

0.9 g (2.3 mmol) 5-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-pyrido [3.2-a] phenazin (8) wurden in 30 ml Methanol gelöst. Unter Rühren wurde auf einmal eine Lösung von 0.85 g (2.3 mmol) Naphthalin-1.5-disulfonsäure x 4 H_2O in 20 ml Wasser zugegeben. Es fiel sofort das Salz aus. Man erhitzte kurz zum Sieden und saugte nach dem Erkalten scharf ab. Es wurden nach dem Trocknen i. Vak. über P_2O_5 1.4 g (89.2 % d. Th.) leuchtend rotes, amorphes Pulver erhalten.

Versuche zur Darstellung von Pyrido [3.2-a] phenazin

- a) 50 mg 5.6-Chinolindion-sulfat, das durch Oxidation von 5-Amino-6-hydroxy-chinolin mit Eisen(III)chlorid hergestellt wurde ⁷⁰⁾, 2 ml Eisessig, 25 mg o-Phenylendiamin und eine Spatelspitze Natriumacetat wurden im Wasserbad zwanzig Minuten erhitzt. Nach 24-stündigem Stehen wurde die rote Lösung mit 2 N NaOH alkalisiert und mit 5 ml Chloroform extrahiert.
- b) 200 mg 5.6-Chinolindion-sulfat, 20 ml Eisessig, 200 mg Bariumacetat und eine Spatelspitze Natriumacetat wurden zehn Minuten zum Sieden erhitzt und anschließend 15 Stunden bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die rote Lösung wurde mit 2 N NaOH alkalisiert und mit 10 ml Chloroform extrahiert.
- c) 100 mg 5.6-Chinolindion-sulfat, 10 ml absoluter Äthanol, eine Spatelspitze wasserfreies Na_2SO_4 , eine Spatelspitze Natriumacetat und 100 mg o-Phenylendiamin wurden zehn Minuten lang zum Sieden erhitzt, anschließend drei Stunden gerührt und die entstandene rote Lösung i. Vak. eingedampft.
- d) 200 mg 5.6-Chinolindion-sulfat und 1 g o-Phenylendiamin wurden in einem Reagensglas in einem Paraffinbad zwanzig Minuten lang auf $180-210^\circ\text{C}$ erhitzt. Bei 190°C begannen Blasen aufzusteigen. Es trat eine Verfärbung über Braun nach Rot ein. Nach dem Erkalten wurde das Reagensglas zerstoßen, in Wasser aufgeschlämmt, mit 2 N NaOH versetzt und mit 10 ml Chloroform extrahiert.
- e) 50 mg 6-Hydroxy-5-nitroso-chinolin ⁷⁰⁾ wurden in 2 ml Eisessig gelöst und erhitzt. 50 ml o-Phenylendiamin und 8 ml HCl ($d=1.12$) wurden tropfenweise zugegeben. Unter Rühren wurde eine halbe Stunde am Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit 2 N NaOH alkalisiert und mit 10 ml Chloroform extrahiert.

Aus keinem der Ansätze konnte das gewünschte Produkt isoliert werden.

1.4. Versuch zur Darstellung von 8-N-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl)-
N-äthylamino-6-methoxy-chinolin

8-(N-Acetyl-N-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl)-amino)-6-methoxy-
chinolin (17) ^{x)}

In einem 5 ml Rundkölbchen wurden 2.7 g (8.6 mmol) 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-6-methoxy-chinolin (16) (Plasmochin^R) in 0.9 g (8.8 mmol) Acetanhydrid gelöst und in einem Paraffinbad bei 150^oC (+ 5^oC) eine Stunde am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die tiefrote Reaktionslösung mit zerstoßenem Eis versetzt, mit konz. Ammoniak pH 10.0 eingestellt und zweimal mit je 15 ml Benzol ausgeschüttelt. Die mit wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknete Benzolphase wurde nach Filtration i. Vak. eingedampft. Man erhielt ein dunkelbraunes Öl. Es zeigte im Dünnschichtchromatogramm mit dem Fließmittel Cyclohexan/Diäthylamin (9+1) zwei im UV blau fluoreszierende Hauptflecke, wovon einer mit $hR_F = 54$ Ausgangssubstanz, der zweite mit $hR_F = 11$ das acetylierte Produkt darstellte. Das Rohprodukt wurde in 10 ml Cyclohexan gelöst und über eine Säule Al₂O₃, neutral (l = 5 cm, ϕ = 2 cm), filtriert. Nacheinander wurde mit Cyclohexan, Benzol und Chloroform eluiert. Das Cyclohexaneluat wurde verworfen, die restlichen vereinigt und i. Vak. einrotiert. Das bräunliche Öl wurde in 5 ml Cyclohexan gelöst und auf fünf Dickschichtplatten aufgetragen. Nach viermaligem Entwickeln mit Cyclohexan/Diäthylamin (9+1) wurden die unteren, blau fluoreszierenden Banden abgekratzt, mit dem Fließmittel eluiert, filtriert und i. Vak. eingedampft. Um evtl. gelöstes Kieselgel zu entfernen, wurde das bernsteinfarbene Öl in absol. Äther aufgenommen, filtriert und erneut i. Vak. einrotiert. Man erhielt 1.3 g (42.5 % d. Th.) nach DC einheitliches Öl.

18.20 mg Substanz (in Eisessig)

1.016 ml 0.1 N HClO₄

x) Diese Verbindung ist in der Übersicht von F. Y. Wiselogle ¹²⁹⁾ aufgeführt. Eine Beschreibung der Synthese und der Eigenschaften von 17 ist in der Literatur jedoch nicht angegeben.

$C_{21}H_{31}N_3O_2$ (357.50)

Ber.: Äquiv.-Masse: 178.8

Gef.: Äquiv.-Masse: 179.1

MS (70 eV): $m/e = 357 (M^+)$, 342, 328, 314

Reduktionsversuch von 8-N-Acetyl-N-(4-diäthylamino-1-methyl-butyl)-amino-6-methoxy-chinolin (17)

1,3 g (3,6 mmol) 8-N-Acetyl-N-(4-diäthylamino-1-methyl-butyl)-amino-6-methoxy-chinolin wurden in 25 ml über Natrium getrockneten Äther gelöst, zu einer Suspension von 135 mg (3,6 mmol) Lithium-aluminiumhydrid in 25 ml getrockneten Äther getropft und unter Rühren 24 Stunden am Rückfluß gekocht. Nach DC mit Cyclohexan/Diäthylamin (9+1) als Fließmittel waren vier blau fluoreszierende Flecken erkennbar. Der Hauptfleck mit $hR_F = 56$ war mit Dragendorff's Reagens anfärbbar und stellte entacetyliertes Produkt dar. Der zweitstärkste Fleck mit $hR_F = 10$ zeigte unveränderte Ausgangsverbindung an. Die beiden schwachen Flecke mit $hR_F = 15$ bzw. 48 waren mit Dragendorff's Reagens nicht bzw. nur sehr schwach anfärbbar. Im Massenspektrum zeigte sich kein Molekülpeak (M^+) mit $m/e = 343$.

1.5. Versuche zur Nitrierung von 5.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (24)

1.5.1. Ausgangsverbindungen

1.3.4-Trimethoxy-5-nitro-benzol (21) ⁹⁵⁾

In einem 1 l Dreihalskolben mit Rührer, Tropftrichter und Dimroth-Kühler wurden 30.0 g (162 mmol) 3-Methoxy-5-nitro-hydrochinon (20) und 149.0 g wasserfreies Kaliumcarbonat in 500 ml wasserfreiem Aceton suspendiert und auf einem Infra-Bad unter Rühren zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 65 ml (d = 1.321, 681 mmol) Dimethylsulfat langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde 24 Stunden unter Rühren und Rückfluß gekocht. Nachdem der Ansatz abgekühlt war, wurde der Niederschlag scharf abgesaugt, zweimal mit Aceton gewaschen und das Filtrat mit Wasser auf das zehnfache Volumen verdünnt. Der gelbe Niederschlag wurde auf einer Fritte gesammelt, mit Wasser gut ausgewaschen und an der Luft getrocknet. Nach dem Umlösen aus Äthanol erhielt man 20.0 g (57.9 % d.Th.) gelbe Kristallnadeln vom Schmelzpunkt 77 - 78.5 °C (Lit. ⁹⁵⁾: 77 °C). Im Dünnschichtchromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Triäthylamin (10+1) erhielt man nach dem Besprühen mit Natrium-Fluoreszein-Lösung einen im UV-Licht violett erscheinenden Fleck mit $hR_F = 74$.

2.3.5-Trimethoxy-anilin (22) ⁹⁵⁾

9.0 g (42.2 mmol) 1.3.4-Trimethoxy-5-nitro-benzol (21) wurden in 250 ml Toluol gelöst, 12.0 g feingepulvertes Eisen und 0.6 ml Eisessig wurden zugegeben und unter heftigem Rühren, wobei das Rührblatt den Boden des Reaktionsgefäßes überstrich, am Rückfluß gekocht. Im Abstand von zehn Minuten wurden jeweils 5-10 Tropfen Wasser zugesetzt. Nach

vier Stunden wurden nochmals 0.2 ml Eisessig und eine Spatelspitze Eisenpulver zugegeben. Nach etwa fünf Stunden war die Reduktion beendet. Es wurde heiß durch einen Heißwassertrichter abfiltriert und zweimal mit wenig heißem Toluol nachgewaschen. Das Filtrat wurde nach dem Trocknen über wasserfreiem Na_2SO_4 i. Vak. eingedampft und man erhielt ein schmutzig-braunes Öl. Es wurde in wenig Benzol gelöst und über eine Säule Al_2O_3 , neutral (l = 8 cm, ϕ = 2.5 cm) filtriert. Die im Dünnschichtchromatogramm einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt und i. Vak. eingedampft. Man erhielt 7.2 g (93.1 % d. Th.) klares, hellbraunes Öl. Im Dünnschichtchromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Triäthylamin (9+1) war nach dem Besprühen mit Natrium-Fluoreszein-Lösung ein im UV-Licht violett erscheinender Fleck mit $\text{hR}_F = 68$ zu erkennen.

5.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (24)

6.5 g (35.5 mmol) 2.3.5-Trimethoxyanilin (22), 4.50 g (45 mmol) Acetylaceton, 0.5 g p-Toluolsulfonsäure und 200 ml Benzol wurden am Rückfluß mit zwischen Kühler und Rundkolben geschalteten Wasserabscheider gekocht. Nach 2 1/2 Stunden war die theoretische Wassermenge, 0.64 ml, abgeschieden. Die orangerote, schwach trübe Lösung wurde nach dem Erkalten filtriert und das Filtrat i. Vak. eingedampft. 9.6 g rot-braunes Öl blieben als Rohprodukt zurück. Im Dünnschichtchromatogramm mit Benzol/Triäthylamin (10+1) zeigte sich im UV nach Besprühen mit Natrium-Fluoreszein-Lösung ein Fleck mit $\text{hR}_F = 74$ von 4-(2.3.5-Trimethoxy-anilino)-3-penten-2-on (23); daneben war noch ein im UV blau fluoreszierender Fleck mit $\text{hR}_F = 55$ erkennbar, der bereits Ringschlußprodukt anzeigte.

Das ölige Rohprodukt wurde unter Rühren in 40 g konz. Schwefelsäure so langsam eingetragen, daß die Reaktionstemperatur 60°C nicht überstieg. Gegebenenfalls wurde unter fließendem Wasser gekühlt. Der Ansatz wurde sofort auf 200 g zerstoßenes Eis gegossen und mit konz. Ammoniak auf

pH 8-9 gebracht. Nach zweistündigem Stehen wurde abgenutscht, der Niederschlag mit Wasser gut gewaschen und über P_2O_5 i. Vak. getrocknet. Es wurden 7,5 g beiges, kristallines Pulver erhalten. Aus 100 ml heißem Ligroin wurde umgelöst. 6,5 g (74,1 % d. Th., bezogen auf 2,3,5-Trimethoxyanilin) fast farblose Kristallnadelchen vom Schmelzpunkt 71-73°C wurden gewonnen. Im Dünnschichtchromatogramm zeigte sich mit dem Fließmittel Benzol/Triäthylamin (10+1) ein im UV blau fluoreszierender Fleck mit $hR_F = 51$, mit dem Fließmittel Benzol/Diäthylamin (9+1) mit $hR_F = 68$.

15.07 mg Substanz (in Eisessig) 0.605 ml 0.1 N $HClO_4$

$C_{14}H_{17}NO_3$ (247.30)

Ber. : Äquiv.-Masse: 247.3

Gef. : Äquiv.-Masse: 249.1

MS (70 eV): $m/e = 247 (M^+)$, 246 ($M-H\cdot$), 232 ($M-CH_3\cdot$), 218 ($M-HCO\cdot$), 204, 189, 161.

1.5.2. Erfolgreiche Nitrierversuche:

a) mit rauchender HNO_3 :

2.0 g (8.1 mmol) 5,7,8-Trimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (24) wurden bei +5°C langsam unter heftigem Rühren in 1 ml rauchende HNO_3 ($d = 1,52$) eingetragen. Nach zehnmütigem Nachrühren wurde auf 100 ml Eiswasser gegossen, mit konz. Ammoniak ein pH-Wert von 8 eingestellt und mit je 50 ml Chloroform zweimal ausgeschüttelt. Eine dünnschichtchromatographische Untersuchung des roten Chloroformextraktes ergab, daß eine Reihe von tiefgefärbten Oxidationsprodukten entstanden war, jedoch eine Nitrierung nicht stattgefunden hatte.

b) mit Acetanhydrid/rauchende HNO_3 :

3.6 ml HNO_3 ($d = 1,52$) wurden unter Kühlen mit einer Eis/Kochsalz-

mischung so langsam in 18 ml Acetanhydrid getropft, daß die Temperatur nicht über -5°C stieg. Diese Nitrierlösung wurde zu einer ebenfalls mit Eis/Kochsalzmischung gekühlten Lösung von 6.0 g (24.3 mmol) 5.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (24) in 20 ml Acetanhydrid unter Rühren zutropft. Es bildete sich ein gelber Niederschlag, dessen Farbe rasch nach orange wechselte. Unter Eigenerwärmung bis 33°C erhielt man eine klare, rote Lösung. Nach einstündigem Nachrühren bei Raumtemperatur wurde auf 100 g zerstoßenes Eis gegossen und unter Rühren konz. Ammoniak bis pH 6 zugegeben. Das ausfallende gelbe Produkt wurde auf einer Fritte gesammelt, mit viel Wasser gewaschen und scharf abgesaugt. Nach dem Trocknen i. Vak. über P_2O_5 erhielt man 3.5 g beiges, amorphes Pulver. Es wurde in wenig Benzol gelöst und die Lösung über eine Säule Al_2O_3 , neutral ($l = 8 \text{ cm}$, $\phi = 2.5 \text{ cm}$) mit 100 ml Benzol chromatographiert. Nach dem Abziehen des Benzols erhielt man 2.7 g fast farbloses, kristallines Pulver vom Schmelzpunkt $146-148^{\circ}\text{C}$. Im Dünnschichtchromatogramm mit dem Fließmittel Benzol/Diäthylamin (9+1) erhielt man nach Besprühen mit Natrium-Fluoreszein-Lösung einen violetten Fleck mit $\text{hR}_{\text{F}} = 71$.

Ein von dieser Substanz hergestelltes Massenspektrum und ein IR-Spektrum ergaben, daß ein Gemisch aus 5-Acetoxy-8-hydroxy-7-methoxy-2.4-dimethyl-chinolin (26, $m/e = 261$, M^+) und wenig 5-Acetoxy-8-hydroxy-7-methoxy-4-methyl-chinaldinsäure (27, $m/e = 291$, M^+) vorliegt (s. Kap. A. 2.10.3.)

c) mit Trifluoracetanhydrid/rauchende HNO_3 :

0.5 g (2.02 mmol) 5.7.8-Trimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin wurden unter Rühren und Kühlen im Eisbad in 5 ml Trifluoracetanhydrid gelöst. Innerhalb von fünf Minuten wurde eine Mischung aus 1.1 ml Trifluoracetanhydrid und 0.1 ml rauch. HNO_3 ($d = 1.52$) zugetropft. Man ließ den rot gefärbten Ansatz dreißig Minuten bei Raumtemperatur rühren. Nach Abziehen des Trifluoracetanhydrids i. Vak. erhielt man ein rotes Öl. Es wurde in 5 ml Chloroform gelöst und die Lösung zweimal mit je 5 ml

gesättigter Natriumcarbonat-Lösung und einmal mit 5 ml Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über wasserfreiem Na_2SO_4 wurde die nun grüne Lösung i. Vak. eingedampft. Es blieben 280 mg grüngelbe Blättchen zurück. Sie wurden in 10 ml Chloroform gelöst und über eine Säule Kieselgel 40 (70-230 mesh, $l = 7$ cm, $\phi = 1$ cm) mit 100 ml Chloroform chromatographiert. Die ersten grüngelb gefärbten 30 ml Eluat wurden i. Vak. einrotiert. Man erhielt 250 mg gelbes, kristallines Pulver, welches sich bei 196°C unter Verkohlungs Zersetzung zersetzte. Nach Umlösen aus Toluol lag der Zersetzungspunkt bei $205\text{--}208^\circ\text{C}$. Im Dünnschichtchromatogramm mit Benzol/Diäthylamin (9+1) als Fließmittel zeigte sich ein roter Fleck bei $R_F = 34$. Eine schwefelsaure Kaliumjodidlösung wurde oxidiert. Die Substanz erwies sich mit 7-Methoxy-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (25) identisch. Die Ausbeute betrug 56,9 % d. Th.

d) mit Nitronium-tetrafluoroborat in TMS:

618 mg (2,5 mmol) 5,7,8-Trimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin wurden in 2,0 ml Tetramethylensulfon gelöst und die Lösung auf $+5^\circ\text{C}$ im Eisbad abgekühlt. Innerhalb von zehn Minuten wurde eine Lösung von 320 mg (2,5 mmol) Nitronium-tetrafluoroborat in 5 ml Tetramethylensulfon tropfenweise zugegeben. Die sich rot verfärbende Lösung wurde erwärmt und eine Stunde bei 60°C gehalten. Man ließ anschließend drei Tage bei Raumtemperatur stehen. Eine Überprüfung mittels DC ergab, daß keine Nitrierung stattgefunden hatte, lediglich Ausgangsprodukt war vorhanden.

e) Nitrosierversuch mit NaNO_2 /konz. H_2SO_4 :

270 mg (3,9 mmol) NaNO_2 wurden unter Wasserkühlung und Rühren in 1,0 ml konz. H_2SO_4 eingetragen und anschließend bis zum Auftreten einer Gelbfärbung erhitzt. Das Nitrosierungsgemisch wurde unter Rühren schnell in einer Eis/Kochsalzmischung auf 0°C abgekühlt. 500 mg (2,02 mmol) 5,7,8-Trimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin wurden in 1,0 ml Essigsäure gelöst und auf -15°C abgekühlt. Das Nitrosierungsgemisch wurde

allmählich unter Rühren so zur Chinolinlösung zugegeben, daß die Temperatur 0°C nicht überstieg. Dabei trat Braunfärbung ein. Nach beendeter Zugabe wurde noch zehn Minuten gerührt, dann in 30 ml Eiswasser gegossen, mit konz. Ammoniak auf pH 7 gebracht und mit 20 ml Chloroform extrahiert. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung des roten Extraktes zeigte neben Ausgangsprodukt lediglich Oxidationsprodukte.

2. Analytische Arbeitsvorschriften

2.1. Allgemeine Angaben

2.1.1. Geräte

Von der Firma Hewlett-Packard GmbH, Böblingen:

Gas-Chromatograph 5755 G mit Doppelflammenionisationsdetektor, modifiziert zum stickstoffselektiven Detektor durch Einbausatz 15161 B; 1 mV Zweikanal-Kompensations-Linienschreiber Moseley H 10-7128 A; Digital-Integrator mit tangentialer Integration und eingebautem Drucker 3370 B; Integrator und Schreiber wurden in Serie hintereinander geschaltet; Änderungen am Detektor (Verlegung des Säulenanschlusses und der Wasserstoffzufuhr in den Ofenraum, Zusatzheizung für den Detektorraum) nach H. Paulus⁸⁵).

Gase der Firma Linde AG, Nürnberg, in Stahlflaschen mit 150 atü: Helium 99.999 %; Wasserstoff, nachgereinigt; Synthetische Luft (20 % Sauerstoff und 80 % Stickstoff).

Zweistufige Druckminderer mit Arbeitsbereich 0-10 atü, Messer-Griesheim GmbH, Düsseldorf.

Gasreinigungsröhren aus Kupfer 22 mm x 350 mm mit Molekularsieb 5 Å in Stäbchenform, E. Merck AG, Darmstadt.

GC-Säulen aus "Durans 50"-Glas: A.D. 6,3 mm, I.D. 3 mm, in den Längen 150 und 200 cm, Glasbläserei Vorndran, Erlangen.

Apparatur zum Imprägnieren der mit Trägermaterial gefüllten Säulen nach H. Paulus⁸⁵).

Mikroliterspritze 701 NW/G, 10 µl, und 710 N, 100 µl, beide mit einzementierter Nadel der Hamilton Company Inc., Whittier, Kalifornien.

Mikroliterspritze 5100 TLC, 100 µl, mit teflonüberzogener Kanüle der Unimetrics Corporation, Anaheim, Kalifornien.

TLC-Applicator der ICN Pharmaceuticals GmbH & Co, Eschwege.

Uniplan Beschichtungsgerät Typ L der Shandon Scientific Company Lt., London.

Spektralphotometer DMR 21 der Firma Carl Zeiss, Oberkochen.
Becherzentrifuge, Stock, Marburg/Lahn, mit 8 freischwingenden
1 Liter-Bechern; maximal 3400 g.

Einsätze aus "Troidur" für Extraktionsgläser, beschrieben bei
H. Paulus ⁸⁵⁾.

Ultraschallbad "Sonorex", Typ RK 82, 40 kHz, Bandelin Electronic KG, Berlin.

Stoffwechselkäfige für Mäuse und Ratten, Nr. 13-1700 der Firma W. Ehret, Emmendingen, dessen mitgelieferte Futtervorrichtung durch ein Vorratsgefäß erweitert worden war ⁺⁾ .

Rotationsschüttelapparat mit stufenloser Drehzahlregelung und zwei mechanischen Getriebestufen, hergestellt in der institutseigenen Werkstatt ⁺⁾ .

Schüttelapparat für die Inkubationsansätze mit horizontaler Auslenkung, stufenloser Drehzahlregelung und zwei Haltevorrichtungen für Inkubationsgefäße, hergestellt in der Institutswerkstatt ⁺⁾ .

Extraktionsgläser aus "Duran 50"-Glas, mit eingeschliffenen Hohlglasstopfen (NS 14.5) und spitzem Boden, Inhalt: 9 ml; dazu passend Teflonstopfen mit Dichtungslamellen, hergestellt in der Institutswerkstatt ⁺⁾ .

Extraktionsgläser aus "Duran 50"-Glas, mit eingeschliffenen Hohlglasstopfen (NS 14.5), Inhalt: 20 ml.

Inkubationsgläser mit flachem Boden, $\phi = 2 \text{ cm}$, $h = 9 \text{ cm}$.

Meßpipetten, 100 μl , 200 μl , 500 μl , 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml.

Einmalspritzen, sterilisiert, 1 ml und Einmalkanülen, sterilisiert Nr.18 und 20.

x) Für die Anfertigung der beschriebenen Geräte und Hilfsmittel danke ich den Herren der Institutswerkstatt, Herrn Mechanikermeister W. Keller und Herrn H. Roth.

2.1.2. Materialien und Reagenzien

Für die Gas-Chromatographie:

Trägermaterial: Chromosorb W (AW-DMCS) H.P., 80-100 mesh,
Johns-Manville Products Corp., New York;

Trennflüssigkeiten: OV-1, OV-101, OV-17, Ohio Valley Chemical
Company;

Toluol p.a., E. Merck AG, Darmstadt;

o-Phenylendiamin zur Synthese, E. Merck AG, Darmstadt.

Für die Dünnschichtchromatographie:

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254, E. Merck AG, Darmstadt;

DC-Karten CE F, Riedel-de Haën AG, Seelze-Hannover;

Kieselgel 60 HR, reinst, nach Stahl, E. Merck AG, Darmstadt;

Leuchtstoff Grün, ICN Pharmaceuticals GmbH & Co., Esch-
wege;

Chloroform DAB 7, Benzol, Methanol, Diäthylamin, Triäthylamin.

Für die Leberschnittversuche:

NaCl p.a., KCl p.a., $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ krist. p.a., KH_2PO_4 p.a. für
Puffergemische nach Sörensen, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ p.a., Riedel-de
Haën, Seelze-Hannover;

D (+)-Glukose-Monohydrat Merck für biochem. und mikrobiol. Zwecke;

o-Nitroanisol, frisch vakuumdestilliert, DC-rein;

p-Nitroanisol, DC-rein, Fp. $53-54^\circ\text{C}$;

Sauerstoff, Linde AG, Nürnberg.

Sonstiges:

0.75-proz. NaCl-Lösung, sterilisiert;

NaOH p.a. reinst, Na_2SO_4 p.a. wasserfrei, Riedel-de Haën AG,
Seelze-Hannover;

Stickstoff, Linde AG, Nürnberg;

Citratpuffer: pH 2.0 , 3.0 , 4.0 ;

Phosphatpuffer: pH 5.0 , 5.5 , 6.0 , 7.0 , 7.4 , 8.0 ;

Boratpuffer: pH 9.0 ;

Extran^(R) MA Ol, alkalisch, E. Merck AG, Darmstadt.

2.1.3. Reinigung der Glasgeräte

Glasgeräte wurden nach mechanischer Reinigung 24 Stunden in eine 3-proz. Extran^(R)-Lösung eingetaucht. Nach Entnahme wurden sie sofort mit Leitungswasser gründlich gespült. Nach Behandlung mit Eisessig zur Entfernung von basischen Substanzen wurden sie nochmals mit Leitungswasser und anschließend mit demineralisiertem Wasser nachgespült. Die Glasgeräte wurden bei 105°C im Trockenschrank getrocknet.

2.1.4. Dünnschichtchromatographie

Die Durchführung der DC erfolgte nach der Standardmethode nach Stahl¹¹⁶⁾, aufsteigend in mit Filterpapier ausgekleideten Trögen (20,5 x 8 x 24 cm) mit unebenen und planen Bodenflächen.

Als DC-Platten wurden entweder Kieselgel-Fertigplatten mit Fluoreszenzindikator der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet, oder die DC-Platten wurden selbst hergestellt. Dazu wurde das Adsorbens (Kieselgel 60 HR reinst nach Stahl) mit 2 % Fluoreszenzindikator (Leuchstoff Grün) versetzt und mit dem Beschichtungsgerät in einer Dicke von ca. 0,25 mm auf 20 x 20 cm Glasplatten aufgebracht.

Durch Ritzen mit einem Mikrospatel wurden die DC-Platten in ca. 3 cm breite Bahnen eingeteilt, wodurch das Auftragen der Substanzlösungen und das Zuordnen bei der Detektion erleichtert wird. Das Auftragen der Analysenlösungen erfolgte mit dem TLC-Applicator unter Verwendung einer 100 µl -Spritze mit teflonüberzogener Kanüle in Form von 1 cm breiten Bändern.

Sollte der Dünnschichtchromatographie noch eine gas-chromatographische oder spektroskopische Bestimmung folgen, so wurden die betreffenden Zonen noch feucht mit einem Spatel abgehoben und die Substanzen im Ultraschallbad mit dem Fließmittelgemisch vom Adsorbens eluiert.

Zur Detektion diente entweder die Eigenfärbung der Flecken oder das Betrachten der Platten in einem Fluotest-Gerät (Tab.4).

Tabelle 4 : Detektion der Dünnschichtchromatogramme

Verb.	Eigenfarbe	Fluoresz. im UV	Fluoresz. -Löschg.
1a		+	
1b		+	
28		+	
16		+	
29		+	
2	+		+
3a	+		+
6	+		
7	+		
4a	+	+	
8	+	+	

Die verwendeten Fließmittel sind bei den jeweiligen Versuchsbeschreibungen angegeben.

2.1.5. Gas-Chromatographie

Der Gas-Chromatograph wurde mit einer Säule und isotherm betrieben.

2.1.5.1. Trennsäulen

Die Vorbehandlung der Glassäulen und des Trägermaterials, das Füllen der

Säulen mit Trägermaterial, das Belegen mit stationärer Phase und die Konditionierung erfolgte nach den bei H. P a u l u s ⁸⁵⁾ angegebenen Verfahren.

Als Trennsäulen wurden verwendet:

1. OV-17-Säulen: Längen 150 und 200 cm
2.5 % OV-17 (Methyl-Phenyl-Silikongummi) auf Chromosorb W (AW-DMCS) H.P. , 80-100 mesh.
2. OV-1-Säule (Länge 150 cm) und OV-101-Säule (Länge 200 cm);
je 4 % Belegung auf Chromosorb W (AW-DMCS) H.P. , 80-100 mesh.

Die mit den Methyl-Silikongummis OV-1 und OV-101 belegten Säulen zeigten eine schlechtere Trennleistung als die beiden OV-17-Säulen, die auch das geringste Tailing bei den polaren Chinolindionen aufwiesen.

Die Trennsäulen reichten in einem Stück vom Einspritzgummi bis zum Detektoranschluß; somit wurden die Analysen direkt auf die Glassäule gegeben. Die Verbindung erfolgte unter Verwendung von jeweils 2 Silikonummiringen.

2.1.5.2. Temperatureinstellungen am Gas-Chromatographen

Tabelle 5:

Verbindungs- klasse	Säule	Temperaturen [°C] von		
		Trenn- säule	Einspritz- block	Detektor/ Detektorblock
5.6-u. 5.8- Chinolindione 2 , 6 , 15	OV-17 1.5 m	220-242	270	280/330
	2 m	248-260	270-296	286-290/320-335
Pyrido [3.2-a] phenazine 4a , 8	OV-17 1.5 m	296	310	300/322
	2 m	295	315	280/318
bas. alkyl. 6-Amino-chino- line 1 a , 1 b	OV-1 1.5 m	230-275	250-300	280/300
	OV-17 2 m	260	290	280/318

2.1.5.3. Einstellung der Gase

Die Gasflüsse wurden mit einem Seifenfilm-Strömungsmesser über unmittelbar nach den Differentialdruckreglern in die Gasleitung eingebaute T-Stücke eingestellt. Es wurden folgende Flußraten eingeregelt (Tab.6):

Tabelle 6 : Gasflußraten

Trärgas	54 - 56 ml/min	Vordruck:	7.0 atü
Wasserstoff	28 - 30 ml/min	Vordruck:	7.5 atü
Luft	180 ml/min	Vordruck:	4.2 atü

Elektrometereinstellung: Range 10^3 ; Papiervorschub: 0.5 inch/min
Einspritzmenge: 1 μ l

2.1.5.4. Einstellungen am Integrator

Die Parameter für den Integrator wurden jeweils den Gegebenheiten der Analyse angepaßt. Nur die Rauschunterdrückung in Stellung 2 und der Bereich 10^3 am Elektrometer wurden für alle Analysen konstant beibehalten.

2.1.5.5. Vorbereitung der gas-chromatographischen Apparatur

Am Abend vor Durchführung einer Analyse wurden Detektor- und Detektorblockheizung auf den gewünschten Betrag eingestellt. Der Einspritzblock und der Säulenofen wurden auf 150°C aufgeheizt; ein Trärgasstrom von ca. 10 ml/min wurde einreguliert. Eine halbe Stunde vor Beginn einer Analyse wurden dann Einspritzblock und Säulenofen auf die Analysen-Temperatur und die Träger- und Brenngase auf die Arbeits-Flußraten eingeregelt. Die Oberfläche des Rubidiumbromidkristalls des "Stickstoff-Detektors" wurde mit einem Glasfaserradierstift von niedergeschlagenen Anteilen der stationären Phase gereinigt. Nach Zündung der Flamme wurde durch Senken des Kristalls zur Brenndüse hin das Ionisationsmaximum aufgesucht. Aus

diesem Maximum wurde der Kristall wieder so weit herausgenommen, daß eine, über längere Zeit stabile, auf keinen Fall ansteigend driftende Basislinie erhalten wurde.

2.1.5.6. Linearität des stickstoffselektiven Detektors

Die Linearität des Ns-FID's für 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolin-dion (2) und für den dafür verwendeten inneren Standard, 6-Methoxy-5,8-chinolindion (6), sowie für 1,3-Dimethyl-5-methoxy-pyrido [3,2-a] phena-zin (4a) und dessen inneren Standard, 1,5-Dimethyl-pyrido [3,2-a] phena-zin, wurde durch GC-Analyse von Verdünnungsreihen im erwarteten Kon-zentrationsbereich überprüft (Abb. 11 und Abb. 12).

Linearität des NsFID's

Abb. 11

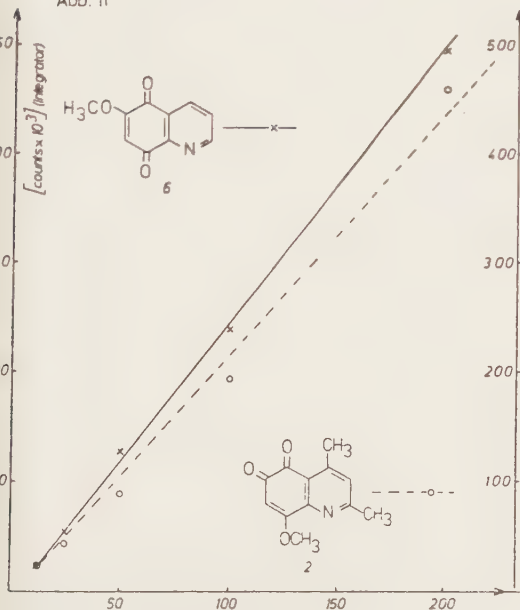
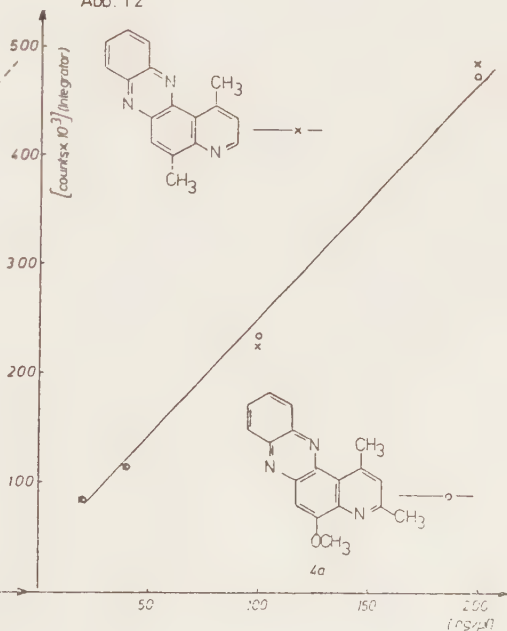


Abb. 12



Aus der gemeinsamen Geraden in Abb. 12 ist zu ersehen, daß die Anzeigeempfindlichkeit des Detektors für beide Pyrido [3.2-a] phenazine gleich groß ist; die relative Anzeigeempfindlichkeit des "Stickstoff-Detektors" für das o-Chinon 2 und dessen innerem Standard, das p-Chinon 6, ist dagegen unterschiedlich groß (Abb. 11), was durch Bestimmung eines Korrekturfaktors berücksichtigt wurde.

2.1.5.7. Auswertung der gas-chromatographischen Analysen

2.1.5.7.1. Qualitative Auswertung

Die qualitative Zuordnung der im Gaschromatogramm erscheinenden Peaks erfolgte mit Hilfe der Gesamtretentionszeiten t_{dr} (min)⁶³⁾ (gleich Aufenthaltszeit in der stationären Phase und in der Gasphase). Die Bestimmung dieser Zeiten wurde mit dem Integrator ausgeführt, welcher gleichzeitig mit der Dosierung der Proben gestartet wurde. Da keine Bezugssubstanz zur Bestimmung von "Relativen Retentionszeiten" eingespritzt wurde, mußte zur genauen Zuordnung die zu bestimmende Substanz bei jeder Analyse probeweise chromatographiert werden. In Tabelle 7 sind die Gesamtretentionszeiten einer Reihe von Chinolindionen, Pyrido [3.2-a] phenazinen und basisch alkylierten 6-Amino-chinolinen mit den dazugehörigen Parametern angegeben, wobei jeweils 100 ng dosiert worden waren.

Tabelle 7 : Gesamtretentionszeiten

Verbindung	t_{dr} [min]	GC - Parameter
Chinolindione		Gasflußraten:
2	1.65	He : 55.5 ml/min
15	1.61	H ₂ : 28.5 ml/min
25	1.32	Luft: 180.0 ml/min
6	1.25	OV-17-Säule 2 m : 260°C
10	0.66	Einspritzblock: 295°C
Pyrido [3.2-a] phenazine		Gasflußraten: wie oben
4a	3.20	OV-17-Säule 2 m: 295°C
7	10.40	Einspritzblock: 315°C
1.5-Dimethyl-pyrido [3.2-a] phenazin	1.43	
6-Aminochinoline		Parameter wie bei Pyrido [3.2-a] phenazinen
1a	2.06	
1b	1.74	

Bei der Gas-Chromatographie der polaren Chinolindione fiel eine Abhängigkeit der Gesamtretentionszeiten von der dosierten Menge auf; je größer die Mengen der eingespritzten Proben waren, desto kürzer waren die Gesamtretentionszeiten. Dieses Verhalten war umso stärker zu beobachten, je niedriger die Trennsäulentemperatur eingestellt war. In Tabelle 8 sind die Gesamtretentionszeiten der Chinolindione 2 und 6 bei zwei verschiedenen Säulentemperaturen für unterschiedliche Mengen aufgeführt.

Tabelle 8: Abhängigkeit der Gesamtretentionszeiten von der Menge

Verbindung	Menge [ng]	t _{dr} bei Säulentemperatur [°C]	
		248	260
2	100	1.94	1.74
	66.67	1.96	1.75
	50	1.99	1.75
	33.33	2.08	1.76
	10	2.19	1.77
6	100	1.45	1.30
	66.67	1.46	1.32
	50	1.54	1.34
	33.33	1.63	1.39
	10	1.80	1.43

Daher mußte zur genauen Zuordnung bei höheren Trennsäulentemperaturen gearbeitet werden, und die parallel eingespritzten Vergleichssubstanzen mußten etwa in gleicher Menge vorliegen.

Eine solche Abhängigkeit der Retentionszeiten wurde auch von Beckett und Mitarb.⁹⁾ und von M.H. Wolf¹³⁰⁾ an Se-30-Säulen bei der Chromatographie von basischen Substanzen, wie Nikotin und Chlorpromazin, festgestellt. L. Eek und T. Galceran³⁵⁾ beobachteten bei Kolonnen mit microporösen Polymeren, wie Poropak Q, Chromosorb 101 und 102 ebenfalls eine Abnahme der Retentionszeiten mit wachsenden Substanzmengen bei der Chromatographie von Aethylacetat und Propan.

2.1.5.7.2. Halbquantitative Auswertung

- 1) Halbquantitative Bestimmung von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) als Metabolit von 1a:

Die halbquantitative Bestimmung von 2 nach den in vivo- und in vitro-Versuchen mit 1a erfolgte auf zwei Weisen:

a) Extraktion des 5,6-Chinolindions (2), Umsetzung mit o-Phenylen-diamin in Eisessig zu 4a und gas-chromatographische Bestimmung von 4a mit 1,5-Dimethyl-pyrido [3,2-a] phenazin als inneren Standard.

b) Extraktion des 5,6-Chinolindions (2), dünn-schichtchromatographische Abtrennung von den Extraktbestandteilen und gas-chromatographische Bestimmung mit 6-Methoxy-5,8-chinolindion (6) als inneren Standard.

zu a) Zur Berechnung des in den Harnproben vorhandenen Chinongehaltes wurde parallel zum Hauptversuch ein Korrekturfaktor F bestimmt, der die Umsetzungsrate der Derivatisierungsreaktion, die Wiederfindung und den Faktor der relativen Anzeigeempfindlichkeit des Detektors für Derivat und Standard (hier gleich 1) in sich vereinigt. Dazu wurden, gleichzeitig zur Durchführung des Hauptversuchs, zu gleichen Mengen Leerurin 2, 4, 10 µg des 5,6-Chinolindions (2) zugesetzt. Extraktion, Derivatisierungsreaktion, Zugabe des inneren Standards und gas-chromatographische Analyse folgten analog. Der Korrekturfaktor F errechnete sich dann nach folgender Gleichung:

$$F = \frac{\text{Menge b } [\mu\text{g}] \quad \times \quad \text{Fläche c } [\mu\text{Vsec}]}{\text{Menge a } [\mu\text{g}] \quad \times \quad \text{Fläche b } [\mu\text{Vsec}] \quad \times \text{ RF}}$$

a = zugesetztes 5,6-Chinolindion (2) in µg

b = zugesetzter innerer Standard in µg

c = Derivat (4a)

RF = Faktor der relativen Anzeigeempfindlichkeit des Detektors für Derivat und Standard, bestimmt in Vorversuchen durch gas-chromatographische Analyse von reinen Lösungen dieser Substanzen und errechnet nach:

$$RF = \frac{\text{Fläche / ng Derivat}}{\text{Fläche / ng Standard}}$$

Die Chinonmenge im Hauptversuch ergab sich dann nach folgender Gleichung:

$$\text{Menge Chinon } \mu\text{g} = \frac{\text{Menge Standard } [\mu\text{g}] \times \text{Fläche Derivat } [\mu\text{Vsec}]}{\text{Fläche Standard } [\mu\text{Vsec}] \times F}$$

Der Wert für F lag zwischen 0,043 und 0,055 und wurde zur Berechnung mit 0,05 angenommen.

zu b) Zur Berechnung nach Verfahren b wurde parallel zum Hauptversuch ein Korrekturfaktor F_k so bestimmt, daß zu gleichgroßen Leerurin-Proben 5, 10, 15, 20 μg des o-Chinons 2 und des, hier als inneren Standard verwendeten p-Chinons 6 zugesetzt wurden und in analoger Weise analysiert wurden. Dieser Faktor beinhaltet die unterschiedliche Anzeigeempfindlichkeit des Detektors für die zu analysierende Substanz und für den inneren Standard und ebenso ihr unterschiedliches Verhalten beim Extraktionsverfahren.

$$F_k = \frac{\text{Fläche / ng Substanz}}{\text{Fläche / ng Standard}}$$

Die o-Chinonmenge im Hauptversuch ergab sich dann aus:

$$\text{Menge o-Chinon } \mu\text{g} = \frac{\text{Menge Standard } [\mu\text{g}] \times \text{Fläche Substanz } [\mu\text{Vsec}]}{\text{Fläche Standard } [\mu\text{Vsec}] \times F_k}$$

- 2) Halbquantitative Bestimmung von 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl-amino)-5,6-chinolindion (7) als Metabolit von 16.

Die Größenordnung der Metabolisierungsrate von Plasmochin^(R) (16) zum 5,6-Chinolindion 7 konnte im Gas-Chromatogramm nur abgeschätzt werden.

da weder stabiles 7 zur Bestimmung eines Korrekturfaktors gewonnen werden konnte, noch ein geeigneter innerer Standard für das chromatographierbare basisch alkylierte 5-Amino-pyrido [3,2-a] phenazin-derivat 8 gefunden werden konnte. Die grobe Abschätzung erfolgte durch Einspritzen einer Verdünnungsreihe von 8 und durch Bestimmung der Umsatzrate von frisch dickschichtgereinigtem 5,6-Chinolindion 7 mit o-Phenylen-diamin zu 8.

2.1.6. Spektrophotometrische Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten der Chinolindione 2, 6, 3a und 7 in Abhängigkeit vom pH-Wert in den Systemen Benzol/Wasser und Chloroform/Wasser wurden Lösungen in den jeweiligen organischen Lösungsmitteln hergestellt, die, je nach zu erwartenden Extinktionswerten, 10^{-2} -, 10^{-3} -, 5×10^{-3} - oder 2×10^{-4} -molar waren.

Davon wurden 0,20, 0,40 oder 0,50 ml in ein Schliff-Reagensglas pipettiert, mit 1,00 ml einer Pufferlösung mit pH-Wert 2,0, 3,0, 4,0 usw. bis 9,0 versetzt und mit 3,00 ml destilliertem Wasser verdünnt. Mit dem jeweiligen organischen Lösungsmittel wurde auf ein Gesamtvolumen von 8,00 ml aufgefüllt.

Mit 50 Umdrehungen/min wurde 30 Minuten um die Querachse der Reagensgläser gedreht. Nach 15 minütigem Zentrifugieren wurden 2,0 ml der organischen Phase entnommen und mit dem Zeiss-Spektralphotometer DMR 21 gegen das jeweilige organische Lösungsmittel gemessen.

Als Berechnungsgrundlage dienten die Extinktionswerte E_1 der langwelligsten Absorptionsmaxima.

Ebenfalls 0,20, 0,40 und 0,50 ml der Chinolindion-Lösungen wurden mit reinen Lösungsmitteln auf 4,00 ml verdünnt, vermessen, und man erhielt bei den gleichen Maxima die Extinktionswerte E_2 . Die Verteilungskoeffizienten k , zwischen organischer und wässriger Phase, ergaben sich als die Quotienten:

$$k = \frac{E_1}{E_2 - E_1}$$

Parallel wurden im gleichen Konzentrationsbereich jeweils drei Messungen in den organischen Lösungsmitteln durchgeführt, um die Gültigkeit des Lambert-Beerschen - Gesetzes zu überprüfen, die nicht immer gegeben war. In diesen Fällen wurden Eichkurven aufgestellt und die Meßwerte korrigiert. Nach Beendigung der Messungen wurden die pH-Werte der wäßrigen Phasen überprüft und die gefundenen Verteilungskoeffizienten als Funktion des pH-Wertes graphisch dargestellt (Abb. 4).

2.1.7. Anreicherung der Chinolindione

Der einfachste Weg einer Anreicherung einer extrahierten Substanz besteht im vorsichtigen Einengen zur Trockene und in der Wiederaufnahme des Rückstandes in einem kleinen Volumen Lösungsmittel²¹⁾.

Dabei sollte so verfahren werden, daß quantitativ in 50 bzw. 100 µl Chloroform oder Toluol wieder gelöst werden kann. Dies kann nur dann gewährleistet werden, wenn der Rückstand auf einen sehr kleinen Bereich des Eingengungsgefäßes beschränkt bleibt. Durch Verwendung von Schliffreagenzgläsern mit spitz ausgezogenem Boden und eines nach M.H. Wolf¹³⁰⁾ variierten Rotavapor nach Büchi gelang es, diese Forderung zu erfüllen. Die Variation am Rotationsverdampfer besteht in einer Verlängerung des Belüftungsrohres mit einem höhenverstellbaren Glasröhrchen von 5 cm Länge und 3 mm innerem Durchmesser. Je nach Höhe des Flüssigkeitsspiegels im Schliffreagenzglas kann dieses Verlängerungsstück aus dem Belüftungsrohr mehr oder weniger weit herausgezogen werden.

Unter langsamem Drehen wurden die Extrakte durch vorsichtiges Einblasen von Stickstoff bei Raumtemperatur zur Trockene eingengt. Die Rückstände befanden sich bei vorsichtigem Arbeiten ausschließlich in der Spitze des Anreicherungsglases und konnten leicht in den kleinen Volumina Lösungsmittel, die mit einer Mikroliterspitze direkt auf den Boden des

Glases aufgegeben wurden, gelöst werden. Ebenso einfach gestaltete sich die Entnahme der Proben für die Dünnschicht- und Gas-Chromatographie. Dieses einfache und substanzschonende Verfahren wurde immer dann angewandt, wenn Anreicherungen erzielt werden sollten oder das Lösungsmittel gewechselt werden mußte, so bei der Überführung der Extrakte von der DC zu gas-chromatographierbaren Toluollösungen.

2.1.8. Versuchstiere

Für die in vivo- und in vitro-Versuche wurden weibliche Mäuse des Stammes NMRI/Orig. Kisslegg aus den Medizinischen Versuchstierzuchten S. Ivanovas, Kisslegg/Allgäu, eingesetzt. Die Tiere waren zur Versuchszeit ca. 9-12 Wochen alt und wogen etwa 20-28 g. Sie erhielten Standard-Diät Altromin^(R) der Firma Altrogge, Lage/Lippe, und Wasser ad libitum. Gehalten wurden sie bei täglich 12 Stunden Tageslichtbeleuchtung mit Leuchtstoffröhren, 55-65 % rel. Luftfeuchtigkeit und einer Raumtemperatur von 24°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Zum Auffangen des Urins wurden je 5 gleichaltrige und ca. gleichschwere Tiere in Stoffwechselkäfige eingesetzt. Vor Durchführung eines Versuchs ließ man die Mäuse sich so lange an die neue Umgebung gewöhnen, bis sich ihre Stoffwechselvorgänge wieder normalisiert hatten. Dies nahm in der Regel drei Tage in Anspruch. Während des Aufenthaltes in den Stoffwechselkäfigen erhielten die Tiere Altromin^(R) in pulverisierter Form.

2.1.9. Herstellung der Leberschnitte

Eine Maus wurde durch Genickschlag getötet und mittels Eröffnung des retroorbitalen Venenplexus, durch Entfernung eines Auges mit einer chirurgischen Pinzette, soweit wie möglich entblutet. Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde die Leber herauspräpariert und nach Entfernung der Gallenblase in Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung bei Raumtemperatur gespült. Zur Herstellung der Gewebeschnitte (Schichtdicke 0,2 - max. 0,5 mm)

2.1.11. Inkubationsapparatur

Die Inkubationsapparatur setzte sich zusammen aus einem thermostatisierbaren Wasserbad, einer Schüttelmaschine mit stufenlos regelbaren horizontalen Schüttelbewegungen und zwei Befestigungsklemmen (polyäthylenüberzogene Federclips Nr. P 760, 16 mm $\varnothing$; Brand, Wertheim) für Inkubationsgefäße und einer Sauerstoffflasche, von welcher aus die Inkubationsansätze über eine mit Wasser gefüllten Waschflasche mittels PVC-Schläuchen (inn. Durchmesser 3 mm) mit Sauerstoff durchperlt wurden.

2.1.12. Herstellung und Applikation der Injektionslösungen für die in vivo -Versuche

Die verwendeten basisch alkylierten 6- und 8-Aminochinoline 1a, 1b und 16 lagen als Naphthalin-1,5-disulfonate vor, deren Basengehalte bei 1a 56,4 %, bei 1b 58,2 % und bei 16 52,2 % betragen.

Um annähernd isotonische Injektionslösungen zu erhalten, wurden die Substanzen kurz vor Versuchsbeginn in sterilisierter 0,75-proz. wäßriger Kochsalzlösung gelöst. Die Konzentrationen der Lösungen wurden so gewählt, daß sich die gewünschte, zu applizierende Dosis in einem Volumen (in ml) befand, die dem Hundertsten Teil des Körpergewichts (in g) einer Maus entsprach.

Die Tiere wurden gewogen und, entsprechend ihrem Gewicht, wurde ihnen die Injektionslösung intra-peritoneal (i.p.) injiziert. Verwendet wurden sterile Einmal-Spritzen mit Einmal-Kanülen Nr. 18 und 20.

2.1.13. Herstellung der Lösungen für die in vitro- Versuche

a) für Leberschnittversuche:

Die verwendeten Aminochinoline 1a und 16 wurden als Naphthalin-

1.5-disulfonate in soviel Inkubationslösung gelöst, daß man nach Zugabe von 1.0 ml dieser Lösungen zu 5.0 ml Inkubationsansatz 10^{-3} -molare Lösungen erhielt.

b) für Autoxidationsversuche:

Es wurden Lösungen der naphthalin-1.5-disulfonsauren Chinolin-derivate 1a, 16, 28 und 29 in frisch destilliertem Wasser hergestellt, die 1.00 mg Base pro ml enthielten.

2.2. Tierversuche

2.2.1. Nachweis von 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-5,6-chinolindion (7) nach Plasmochingabe im Urin der Maus mittels DC und GC.

Fünf Mäuse, welchen 10 mg/kg 8-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-6-methoxy-chinolin (16, Plasmochin^(R)) intraperitoneal verabreicht worden waren, wurden in einen Stoffwechselkäfig eingesetzt. In das Harnauffanggefäß wurde 1.0 ml 2-proz. Schwefelsäure vorgelegt. Als Vergleiche wurden parallel angesetzt:

- a) fünf unbehandelte Tiere in einem Stoffwechselkäfig, in dessen Harnsammelgefäß die gleichen Mengen an Injektionslösung und Schwefelsäure vorgelegt worden waren.
- b) in einem 25 ml Erlenmeyer die gleichen Mengen an Injektionslösung und Schwefelsäure.
- c) in einem 25 ml Erlenmeyer die gleiche Menge an Injektionslösung, ohne Zugabe von Schwefelsäure.

13 Stunden lang wurde der Harn im Hauptversuch und im Vergleichsansatz a) gesammelt.

Dann wurden die Ansätze durch Zugabe von 3 Tropfen 25-proz. Natronlauge alkalisch gemacht und sofort mit je 2.00 ml Chloroform extrahiert und zentrifugiert. 1.50 ml der Chloroformphase wurden in Reagensgläser mit Schliff und spitzem Boden überführt und das Extraktionsmittel mit Stickstoff weggeblasen. Nach Zugabe von 0.5 ml Eisessig und einigen Kriställchen o-Phenylendiamin zum Rückstand wurde auf dem Wasserbad 5 Minuten auf 90-95°C erwärmt, anschließend drei Stunden bei Raumtemperatur verschlossen stehengelassen.

Der Eisessig wurde mit Stickstoff am Rotavapor entfernt, und zum Rückstand wurden 1.50 ml Chloroform, 3 Tropfen 25-proz. Natronlauge und 1 Spatelspitze wasserfreies Natriumsulfat gegeben. Nach kurzem Eintauchen in ein Ultraschallbad wurde filtriert, das Lösungsmittel wie oben

entfernt und der Rückstand, nach Lösen in 0,10 ml Chloroform, wie in Kapitel B. 2.1.4. beschrieben, auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Nach dem Entwickeln mit Benzol Diäthylamin (9+1) wurden die Zonen, welche im UV das stark grüngelb fluoreszierende Phenazinderivat anzeigten, abgehoben, mit Chloroform extrahiert und der Rückstand nach dem Eindampfen in je 0,10 ml Toluol p.a. aufgenommen. Je 1,0 µl der Toluollösung wurde in den Gas-Chromatographen eingespritzt.

- 2.2.2. Nachweis von 8-Methoxy-2,4-dimethyl-5,6-chinolindion (2) nach Gabe von Ni 147/36 (1a) bzw. dessen N-Äthyl-Analogen (1b) im Urin der Maus mittels DC und GC.

a) Mit Derivatisierung:

Je einer Gruppe von fünf Mäusen wurden 30 mg/kg 1a bzw. 1b intra-peritoneal verabreicht. Durch Ausstreifen der Blase wurde 3 1/2 Stunden lang der Urin in einer Vorlage mit 1,0 ml 2-proz. Schwefelsäure gesammelt.

Gleichzeitig wurde der Urin in derselben Weise von zwei Kontrollgruppen in eine Vorlage entleert, die die gleiche Menge Injektionslösung und Schwefelsäure enthielt.

Die Ansätze wurden mit 8 ml Phosphatpuffer auf pH 5,8 gebracht und zweimal mit zunächst 5,0, dann 2,0 ml Chloroform durch Schütteln von Hand extrahiert. Nach dem Waschen mit 1,5 ml 0,05-proz. Schwefelsäure wurden die Chloroformphasen mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und die Filtrate i. Vak. zur Trockene eingedampft. Die Rückstände wurden in 1,0 ml Äthanol gelöst mit einigen Kriställchen o-Phenylendiamin versetzt und zwei Minuten zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen und Einengen i. Vak. wurden die roten Rückstände in je 0,10 ml Toluol p.a. aufgenommen. Je 1,0 µl wurden gas-chromatographiert.

b) Mit Derivatisierung und Zugabe eines inneren Standards:

Eine Gruppe von fünf Mäusen wurde mit 30 mg/kg 1a i.p. behandelt

und in einen Stoffwechselkäfig eingesetzt. Im Harnauffanggefäß wurde 1,0 ml 2-proz. Schwefelsäure vorgelegt. Vergleiche wurden analog Kapitel B. 2.2.1. angesetzt.

Nach 24 Stunden wurde der Versuch abgebrochen, die Ansätze, wenn erforderlich, auf 5,0 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt und mit Phosphatpuffer auf den pH-Wert 5,8 gebracht. Es wurde in Extraktionsgläser überführt und mit je 2,00 ml Chloroform durch 20-minütiges Rotieren um die Querachse extrahiert und anschließend zentrifugiert. 1,50 ml der Chloroformphasen wurden mit Stickstoff nach Kap. B. 2.1.7. zur Trockene gebracht. Die Rückstände wurden in 1,0 ml einer Lösung von o-Phenylen-diamin in Eisessig (5 mg / 20 ml) gelöst und 30 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach dem Abkühlen wurde der Eisessig durch Einblasen von Stickstoff entfernt, je 10 µg 1.5-Dimethylpyrido [3.2-a] phenazin als innerer Standard in Form einer Toluollösung zugegeben und das Toluol mit Stickstoff weggeblasen. Zu den Rückständen wurden je 1,0 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung und 0,10 ml Toluol zugegeben und zwei Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Nach 20-minütigem Zentrifugieren wurden die überstehenden Toluolphasen im Gas-Chromatographen untersucht.

c) Ohne Derivatisierung mit DC-GC-Kopplung:

Hauptversuch und Vergleichsansätze wurden wie bei b) ausgeführt, die Dauer des Versuches jedoch auf 13 Stunden begrenzt.

Nachdem der pH-Wert auf 5,8 eingestellt worden war, wurden je 15 µg 6-Methoxy-5.8-chinolindion (6) als innerer Standard in Form einer wäßrigen Lösung zupipettiert. Nach Extraktion mit je 2,00 ml Chloroform und Eindampfen von jeweiligen 1,50 ml der Chloroformextrakte unter Stickstoff wurden die so gewonnenen Rückstände in 0,10 ml Chloroform wieder gelöst. Diese Lösungen wurden, wie in B. 2.1.4. beschrieben, auf eine Kieselgel-DC-Platte aufgebracht und mit Chloroform/Methanol (9+1) entwickelt.

Die betreffenden Zonen wurden abgehoben, mit 1,5 ml Fließmittel eluiert,

die Eluate filtriert, zur Trockene gebracht und die gewonnenen Rückstände als Lösungen in je 0.10 ml Toluol p.a. gas-chromatographisch untersucht.

2.2.3. In vivo-N-Entäthylierung von 6-N-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl)-N-äthylamino-5.8-dimethoxy-2.4-dimethyl-chinolin (1b).

Während einer Prüfung der Verbindung 1b auf biologische Wirksamkeit wurden drei Gruppen von je fünf mit Plasmodium berghei infizierten Mäusen, die 2, 10 bzw. 50 mg/kg 1b als Naphthalin-1.5-disulfonat i.p. erhalten hatten, 2 1/2 Stunden lang nach der Applikation der Urin durch Ausstreifen der Blase in eine Vorlage mit 1.0 ml 0.2-proz. Schwefelsäure entnommen. Nach Überführung in 9 ml Schliff-Reagensgläser wurde mit einem Tropfen 25-proz. Natronlauge alkalisiert, mit 0.50 ml Toluol versetzt und per Hand 2 Minuten geschüttelt. Nach kurzer Behandlung mit Ultraschall wurde scharf zentrifugiert. Die Toluolphase wurde abgehoben, auf wenige µl eingeengt und auf Kieselgel-DC-Platten punktförmig aufgetragen. Mit Benzol/Triäthylamin (9+1) wurde entwickelt. Im UV-Licht zeigten sich insgesamt sechs fluoreszierende Flecke, von welchen die beiden intensivsten als 1b und als entäthyliertes Produkt 1a durch Vergleich zu identifizieren waren.

2.3. Leberschnittversuche

2.3.1. Überprüfung der O-Demethylierungsfähigkeit der Leberschnitte mit o- und p-Nitroanisol

In zwei getrennten Ansätzen wurden die Schnitte einer Leber (ca. 1.1 g) in 5.0 ml Inkubationslösung gegeben und soviel einer wäßrigen Lösung von o- bzw. p-Nitroanisol zugesetzt, daß 10^{-3} -molare Lösungen entstanden.

Bei 38°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) wurde unter Durchperlen von wassergesättigtem Sauerstoff und Schütteln 2 Stunden lang inkubiert. Nach Zugabe von je 1.0 ml 2 N Salzsäure wurden die Inkubationsansätze in 9 ml Reagensgläser mit Schliff und spitzem Boden überführt und je 2.00 ml Äther zugesetzt. Durch halbstündige Rotation um die Querachse mit 40 Umdrehungen/min wurde extrahiert. Nach scharfem Zentrifugieren wurden die überstehenden rötlichen ätherischen Phasen abgehoben, in Schliffreagensgläser mit spitzem Boden überführt und das Extraktionsmittel am Rotavapor mit Stickstoff nach Kap. B. 2.1.7. weggeblasen. Der Rückstand wurde in 5 Tropfen wäßriger 1-proz. Natriumcarbonatlösung aufgenommen, ein Aliquot auf mit Cellulose beschichteten DC-Platten (DC-Karten CE F) aufgetragen und mit n-Butanol, gesättigt mit 5 N Ammoniak, entwickelt. p-Nitrophenol zeigte sich als gelber Fleck mit R_F 53; o-Nitroanisol wurde nach DC nicht zu o-Nitrophenol entmethyliert.

2.3.2. Inkubation von Leberschnitten mit Ni 147/36 (1a) und Plasmochin^(R) (16)

2.3.2.1. Inkubation

In einem Glasgefäß mit flachem Boden ($\phi = 2$ cm, $h = 9$ cm) wurden die Schnitte einer Leber in 5.0 ml Inkubationslösung eingebracht. Das Gefäß wurde in eine der Halterungen der Schüttelmaschine eingespannt und der

PVC-Schlauch der Sauerstoffzufuhr bis auf den Grund des Inkubationsgefäßes geführt. Er wurde am oberen Rand des Gefäßes mit Klebeband befestigt. Zu $\frac{2}{3}$ seiner Höhe wurde der Ansatz in das Wasserbad eingetaucht und die Sauerstoffzufuhr sofort geöffnet. Nach fünfminütiger Eingewöhnungszeit wurde die Substanzlösung von 1a bzw. 16, wie in B. 2.1.13. beschrieben, mit einer Pipette zugefügt. Anschließend wurde 2 Stunden bei 38°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) unter leichtem horizontalem Schütteln und Durchperlen von Sauerstoff inkubiert.

2.3.2.2. Vergleichsansätze

Unter den gleichen Bedingungen inkubierte man zwei Ansätze, von welchen der eine lediglich Leberschnitte ohne Substanzzusatz enthielt, und der zweite nur Substanz, d.h. ohne Gewebeschnitte.

2.3.2.3. Extraktion

a) Inkubationsansätze mit 1a:

Die Ansätze wurden quantitativ in 25 ml Schüttelgläser mit Schliff überführt, mit einem Tropfen 2 N Salzsäure versetzt und mit Phosphatpuffer pH 5,5 auf diesen pH-Wert gebracht. Nach Zugabe von 2.0 ml Chloroform wurde 30 Minuten derart extrahiert, daß man auf der Rotationsschüttelapparatur mit max. 40 Umdrehungen/min um die Querachse der Schüttelgläser rotieren ließ. Dazu wurden die Gläser mit Teflonstopfen verschlossen.

Nach 30-minütigem, scharfem Zentrifugieren befanden sich die Gewebeschnitte als schmale, scharfe Zonen zwischen Chloroform- und der Wasserphase. Die obere wäßrige Schicht wurde mit einer Pipette abgehoben; zum Rest wurde eine kleine Spatelspitze wasserfreies Natriumsulfat gegeben, kurz per Hand durchgeschüttelt und anschließend in ein 9 ml Reagensglas mit Schliff und spitzem Boden filtriert. Mit zweimal 0.5 ml Chloroform wurden Schüttelglas und Filter nachgespült.

Die abgehobenen wäßrigen Phasen wurden mit je einem Tropfen 25-proz. Natronlauge alkalisiert, mit je 2.0 ml Chloroform versetzt und in gleicher Weise extrahiert und aufgearbeitet.

Die so im schwach sauren bzw. im alkalischen Milieu gewonnenen Chloroformextrakte wurden am Rotavapor bei Raumtemperatur, wie in Kapitel B. 2.1.7. beschrieben, zur Trockene eingengt.

b) Inkubationsansätze mit 16:

Die hier doppelt durchgeführten Inkubationsansätze wurden quantitativ in 25 ml Schüttelgläser mit Schliff überführt, mit je einem Tropfen 25-proz. Natronlauge alkalisiert und nach Zugabe von je 2.0 ml Chloroform 30 Minuten wie bei a) extrahiert, anschließend 30 Minuten scharf zentrifugiert und die Chloroformphasen in 9 ml Reagensgläser mit Schliff und spitzem Boden filtriert.

Nach dem Wegblasen des Chloroforms mit Stickstoff (Kap. 2.1.7.) wurden zu einer Hälfte der Ansätze 5 Tropfen Eisessig und einige Kriställchen o-Phenylendiamin zugegeben und, wie in Kap. 2.2.1. beschrieben, derivatisiert, extrahiert und zur Trockene eingengt. Die andere Hälfte der Ansätze wurde ohne Derivatisierung dünnschichtchromatographiert.

2.3.2.4. DC

Die Rückstände wurden in je 0.10 ml Chloroform durch kurzes Eintauchen in ein Ultraschallbad gelöst. Diese Lösungen wurden, wie in B. 2.1.4. beschrieben, auf Kieselgel-Platten aufgetragen. Als Vergleich wurden die jeweilige Ausgangssubstanz und die erwarteten 5.6- bzw. 5.8-Chinoline mit aufgetragen. Entwickelt wurde in den Fließmittelsystemen:

a) Chloroform/Methanol 9+1

b) Benzol/Diäthylamin 9+1, bzw. Benzol/Triäthylamin 9+1

2.3.2.5. Zusätzliche Auswertung durch GC (a) und UV-Spektroskopie (b)

Mit einem Spatel wurden die in Frage kommenden Zonen von der noch feuchten Platte abgehoben und in 10 ml Erlenmeyerkölbchen überführt. 1.0 ml eines Lösungsmittelgemisches aus Chloroform/Methanol (8+2) wurde zugefügt und 2 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Vom Kieselgel wurde in 9 ml Reagensgläser mit Schliff und spitzem Boden abfiltriert; Erlenmeyer und Filter wurden zweimal mit je 0.5 ml Methanol nachgespült. Dann wurde das Lösungsmittelgemisch, wie in B. 2.1.7. beschrieben, mit Stickstoff am Rotavapor weggeblasen.

a) GC

Die erhaltenen Rückstände wurden in 50 oder 100 μ l Toluol p.a. gelöst. Von diesen Lösungen wurde jeweils 1.0 μ l eingespritzt.

b) UV-Spektroskopie

Die erhaltenen Rückstände wurden in 1.50 ml Chloroform gelöst, die Lösungen in 3 ml Quarzküvetten mit der Schichtdicke 1 cm überführt und mit dem Zeiss - Spektralphotometer DMR 21 UV-Absorptionsspektren aufgenommen. Vergleichsspektren wurden von Substanzen gewonnen, die ebenfalls von Kieselgel-DC-Platten eluiert worden waren.

2.3.3. Nachweis von 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butylamino)-2,4-dimethyl-5,8-chinolindion (3a) in Leber der Maus nach i.p. - Gabe von Ni 147/36 (1a).

Fünf Mäusen wurden 20 mg/kg Ni 147/36 (1a) i.p. verabreicht. Zwei Stunden nach der Applikation wurden die Tiere durch Genickschlag getötet, entblutet, die Lebern entnommen und nach der beschriebenen Methode geschnitten. Die Schnitte wurden in ein 20 ml Schliffreagenzglas, das 15 ml Krebs-Ringer -Phosphatlösung und 2.00 ml Chloroform enthielt überführt und mit 6 Tropfen 25-proz. Natronlauge alkalisiert (pH > 10). Eine halbe Stunde wurde durch Rotation um die Querachse (40 Umdrehun-

gen/min) extrahiert und anschließend scharf zentrifugiert. Die Chloroformphase wurde entnommen, der wäßrige Überstand mit den Gewebeschnitten wurde mit konz. Salzsäure auf pH 2 gebracht, zwei Minuten in einem siedenden Wasserbad erhitzt, nach dem Abkühlen wieder mit 25-proz. Natronlauge alkalisiert und wie oben mit 2,00 ml Chloroform erneut extrahiert.

Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer eingeengt und je zur Hälfte auf 2 Kieselgel-Dünnschichtplatten aufgetragen. Entwickelt wurde mit Benzol/Diäthylamin 9+1 und Chloroform/Methanol 9+1. Die auf der Höhe des als Vergleich mitlaufenden 5,8-Chinolindion 3a liegenden orange-gefärbten Flecken wurden mit Methanol vom Adsorbens gelöst und von dieser Lösung ein UV-Spektrum aufgenommen.

2.4. Autoxidationsversuche

2.4.1. Autoxidationsversuche mit wäßrigen Lösungen von basisch alkylierten 5-, 6- und 8-Aminochinolinen und von 6-(2-Diäthylamino-äthoxy)-5,8-dimethoxy-2,4-dimethyl-chinolin (29).

2.4.2. Inkubation

Je 100 ml der nach Kap. B. 2.1.11b hergestellten wäßrigen Lösungen von 1a, 16, 28 und 29 wurden in ein 25 ml Weithals-Erlenmeyer-Kölbchen zu a) 4.00 ml Phosphatpuffer, pH 5.0 (5.5), und b) 4.00 ml Phosphatpuffer, pH 7.4, pipettiert und die Ansätze 13 Stunden ohne zu schütteln bei 24°C offen im Dunkeln stehengelassen.

2.4.3. Extraktion

Die Ansätze wurden in 9 ml Reagensgläser mit Schliff und spitzem Boden überführt; 2.00 ml Chloroform wurden zugesetzt und, wie in Kap. B 2.3.2.3. beschrieben, extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die wäßrige Phase abgehoben und 1.50 ml des Chloroform-Extraktes wurden am Rotavapor durch Einblasen von Stickstoff zur Trockenen gebracht.

2.4.4. DC, GC und UV-Spektroskopie

Wie in Kap. B 2.1.4. beschrieben wurden die Extrakte auf Kieselgel-DC-Platten aufgetragen und mit Chloroform/Methanol (9+1) entwickelt. Die in Frage kommenden Zonen wurden, wie in Kap. B. 2.1.4. angegeben, zur GC bzw. UV-Spektroskopie aufgearbeitet.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) T.K. Adler und M.E. Latham, Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,
73, 401 (1950)
- 2) A.S. Alving, B. Craige, Jr., R. Jones, Jr., C.M. Whorton,
T.N. Pullman und L. Eichelberger, J. Clin. Invest.
27, 25 (1948)
- 3) A.S. Alving, R.D. Powell, G.J. Brewer und J.D. Arnold, in:
Drugs, Parasites and Hosts (Eds. L.G. Goodwin und R.H.
Nimmo Smith), Churchill, London 1960, ref. in 121
- 4) A.S. Alving, T.N. Pullman, B. Craige, Jr., R. Jones, Jr.,
C.M. Whorton und L. Eichelberger, J. Clin. Invest.,
27, 34 (1948)
- 5) H. Andersag, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 81, 499 (1948)
- 6) J. Axelrod, J. Pharmacol. Exp. Ther. 115, 259 (1955)
- 7) R. Baltzly und E. Lorz, J. Am. Chem. Soc. 70, 861 (1948)
- 7a) M. Barbier, J. Chromatogr. 2, 649 (1959)
- 8) H. Barnickel, Dissertation, Erlangen 1968
- 9) A.H. Beckett, G.T. Tucker und A.C. Moffat, J. Pharm.
Pharmacol. 19, 273 (1967)
- 10) St. Berger und A. Rieker in: The Chemistry of Functional Groups.
The Chemistry of the Quinoid Compounds (Ed.: S. Patai),
Part 1, S.163, Interscience Publ. John Wiley & Sons,
London - New York - Sidney - Toronto 1974
- 11) R.W. Berliner, Privatmitteilung, ref. in 61
- 12) R.W. Berliner, D.P. Earle, Jr., J.V. Taggart, W.J. Welch,
C.G. Zubrod, P. Knowlton, J.A. Atchley und J.A.
Shannon, J. Clin. Invest. 27, 108 (1948)
- 13) C. Beyer, J. Prakt. Chem. 33, 393 (1886)
- 14) K.C. Blanchard, in: F.Y. Wiselogle, A Survey of Antimalarial
Drugs 1941-1945, S. 129, J.W. Edwards, Ann Arbor,
Michigan, 1946

- 157 W.E. Bondinell, C.D. Snyder und H. Rapoport, a) J. Am. Chem. Soc. 91, 6889 (1969); b) J. Org. Chem. 36, 3951 (1971)
- 158 V.H. Booth, Chromatogr. Rev. 7, 98 (1965)
- 159 W. Brackman und E. Havinga, Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 74, 937 (1955)
- 160 C.K. Bradsher, Chem. Rev. 38, 447 (1946)
- 161 B.B. Brodie und J. Axelrod, J. Pharmacol. Exp. Ther. 97, 58 (1949)
- 162 B.B. Brodie und S. Udenfriend, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74, 845 (1950)
- 163 R.B. Bruce und W.R. Maynard, Anal. Chem. 41, 977 (1969)
- 164 F.J. Bullock und J.F. Tweedie, J. Med. Chem. 13, 261 (1970)
- 165 K.N. Campbell, J.F. Kerwin, A.H. Sommers und B.K. Campbell, J. Am. Chem. Soc. 68, 1559 (1946)
- 166 E. Carstanjen, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 2, 633 (1869)
- 167 R.D. Chambers, P. Goggin und W.K.R. Musgrave, J. Chem. Soc. 1959, 1804
- 168 G.V. Chelintsev und B.M. Dubinin, J. Gen. Chem. (USSR) 10, 1395 (1940), ref. C.A. 35, 3641 (1941)
- 169 W.G. Christiansen und M.A. Dolliver, J. Am. Chem. Soc. 63, 1470 (1941)
- 170 G.R. Coatney, W.C. Cooper, N.B. Eddy und J. Greenberg, Survey of Antimalarial Agents, Public Health Monograph No. 9. Public Health Serv. Publ. No. 193, U.S. Governm. Print. Off., Washington 1953
- 171 A. Combes, Bull. Soc. Chim. 49, 89 (1888)
- 172 B. Craige, Jr., L. Eichelberger, R. Jones, Jr., A.S. Alving, T.N. Pullman und C.M. Whorton, J. Clin. Invest. 27, 17 (1948)
- 173 H.D. Dakin, J. Am. Chem. Soc. 42, 477 (1909)

- 32) W. Deutsch, J. Physiol. (London) 87, 56 P (1936)
- 32a) M. Donike, L. Jaenicke, D. Stratmann und W. Hollmann,
J. Chromatogr. 52, 237 (1970)
- 33) N.L. Drake und Y.T. Pratt, J. Am. Chem. Soc. 73, 544 (1951)
- 34) N.L. Drake, J. van Hock, J.A. Garman, R.A. Hayes, R.B.
Johnson, G. Kelley, S. Melamed und R.M. Peck,
J. Am. Chem. Soc. 68, 1529 (1946)
- 35) W. Dummmler und P. Dörfling, J. Chromatogr. 30, 263 (1967)
- 36) L. Eek und T. Galcerán, Chromatographia 2, 541 (1969)
- 37) R.C. Elderfield, C.B. Kremer, S.M. Kupchan, O. Birstein und
G. Cortes, J. Am. Chem. Soc. 69, 1258 (1947)
- 38) R.C. Elderfield, H.E. Mertel, R.T. Mitch, I.M. Wempen
und E. Werble, J. Am. Chem. Soc. 77, 4816 (1955)
- 39) R.C. Elderfield und Mitarb., J. Am. Chem. Soc. 68, 1524 (1946)
- 40) R.C. Elderfield und E. Werble, Privatmitteilung, ref. in:
61 und 60
- 41) E.F. Elslager, M.P. Hutt und L.M. Werbel, J. Heterocycl.
Chem. 6, 99 (1969)
- 42) H.A. Feldman, H. Packer, F.D. Murphy und R.B. Watson,
J. Clin. Invest. 26, 77 (1947)
- 43) E. Fink, P. Nickel und O. Dann, Arzneim. Forsch. 20, 1775 (1970)
- 44) E. Fink, Persönliche Mitteilung
- 45) O. Fischer und E. Renouf, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 17, 1644 (1884)
- 46) T. Furuya, S. Shibata und H. Iizuka, J. Chromatogr. 21, 116 (1966)
- 47) P.D. Gardner, J. Am. Chem. Soc. 76, 4550 (1954)
- 48) Q.M. Geiman, Proceedings of the Fourth International Congresses
on Tropical Medicine and Malaria, D.C. Department of State
Publication 3246, 1, 618 (1948), ref. in: 61 und 51
- 49) J.R. Gillette, B.B. Brodie und B.N. La Du, J. Pharmacol. Exp.
Ther. 119, 532 (1957)

- 49) E. Graef, J.M. Fredericksen und A. Burger, J. Org. Chem. 11, 257 (1946)
- 50) J. Greenberg, E.S. Josephson, H.L. Bami und D.J. Taylor, Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 10, 302 (1951)
- 51) J. Greenberg, D.J. Taylor und E.S. Josephson, J. Infect. Dis. 88, 163 (1951)
- 52) J. Heiss, K.-P. Zeller und A. Rieker, Org. Mass Spektrom. 2, 1325 (1969)
- 53) H. Hettche, Dissertation, Erlangen 1972
- 54) O. Hinsberg, Justus Liebigs Ann. Chem. 237, 327 (1887)
- 55) W.-R. Hölzel, Dissertation, Erlangen 1971
- 55a) W.-R. Hölzel, Unveröffentlichte Versuche
- 56) H. Hörmann, Angew. Chem. 68, 601 (1956)
- 57) I.G. Farbenindustrie AG, Ind. Pat. 25810 (25.Okt.1938), [Chem. Zentralbl. 1939 II, b, 2446] [Chem. Zentralbl. 1941 II, b, 1767]
- 58) I.G. Farbenindustrie AG (Erf. H. Andersag, S. Breitner und H. Jung), D.R.P. 683 692 (26.Okt.1939), [C.A. 36, 4973 (1942)]
- 59) Inorg. Synth. 4, 12
- 60) E.S. Josephson, J. Greenberg, D.J. Taylor und H.L. Bami, J. Pharmacol. Exp. Ther. 103, 7 (1951)
- 61) E.S. Josephson, D.J. Taylor, J. Greenberg und A.P. Ray, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 76, 700 (1951)
- 62) K.-P. Juling, Unveröffentlichte Versuche
- 63) R. Kaiser, Chromatographie in der Gasphase, Bibliographisches Institut, Mannheim / Zürich 1969
- 64) E. Leibnitz und H.G. Struppe, Handbuch der Gas-Chromatographie, 2.Auflage, S. 178. Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße 1970

- 63b) H.K. Lichtenthaler, J. Chromatogr. 13, 166 (1964)
- 64) F. Lions, J. Proc. R. Soc. N.S. W. 63, 159 (1930), ref. Chem. Zentralbl. 1933, I, 1781
- 65) F. Lions, W.H. Perkin und R. Robinson, J. Chem. Soc. 127, 1162 (1925)
- 66) D.A. Libby, A.R. Prosser und A.J. Sheppard, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 50, 806 (1967)
- 67) D.A. Libby und A.J. Sheppard, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 48, 973 (1965)
- 68) K.-G. Lisson, Dissertation, Erlangen 1975
- 69) R. Long und K. Schofield, a) J. Chem. Soc. 1953, 161; b) J. Chem. Soc. 1953, 3919
- 70) J. Mathéus, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 21, 1886 (1888)
- 71) H. Mauss und F. Mietzsch, Klin. Wochenschr. 12, 1276 (1933)
- 72) F. Mietzsch und H. Mauss, Angew. Chem. 47, 633 (1934)
- 73) C. Mitoma, H.S. Posner, H.C. Reitz und S. Udenfriend, Arch. Biochem. Biophys. 61, 431 (1956)
- 74) F. Möller, in: Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller), 4. Aufl., Bd. 11/1, S. 826, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1957
- 75) U. Münch, Dissertation, Erlangen 1972
- 76) O.C. Musgrave, Chem. Rev. 69, 499 (1969)
- 77) K.J. Netter, a) Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 238, 292 (1960); b) Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. Exp. Pathol. 262, 375 (1969)
- 78) K.J. Netter und G. Seidel, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 246, 59 (1963)
- 79) P. Nickel, Habilitationsschrift, Erlangen 1969
- 80) P. Nickel, Persönliche Mitteilung
- 81) P. Nickel, Unveröffentlichte Versuche

- 82) P. Nickel und E. Fink, Justus Liebigs Ann. Chem. 1976, 367
- 83) P. Nickel, L. Schrimpl, E. Fink und O. Dann, Justus Liebigs Ann. Chem. 744, 119 (1971)
- 84) G.A. Olah (Ed.), Friedel-Crafts and Related Reactions, Vol. III, Interscience Publ., New York 1964
- 84a) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12.Ed., 1975 (Ed.: W. Horwitz), Publ. by the A.O.A.C., Washington
- 85) H. Paulus, Dissertation, Erlangen 1972
- 86) V. Petrov und B. Sturgeon, J. Chem. Soc. 1954, 570
- 87) T.H. Porter, C.M. Bowman und K. Folkers, J. Med. Chem. 16, 115 (1973)
- 88) T.H. Porter und K. Folkers, Angew. Chem. 86, 635 (1974)
- 89) T.H. Porter, F.S. Skelton, C.M. Bowman und K. Folkers, J. Med. Chem. 15, 504 (1972)
- 90) T.H. Porter, F.S. Skelton und K. Folkers, a) J. Med. Chem. 14, 1029 (1971); b) J. Med. Chem. 15, 34 (1972)
- 91) Y.T. Pratt, J. Org. Chem. 27, 3905 (1962)
- 92) Y.T. Pratt und N.L. Drake, a) J. Am. Chem. Soc. 77, 37 (1955); b) J. Am. Chem. Soc. 82, 1155 (1960)
- 93) L. Preißinger, Dissertation, Erlangen 1970
- 93a) P.P. Rai und T.D. Turner, J. Chromatogr. 110, 401 (1975)
- 94) J. Renson, H. Weissbach und S. Udenfriend, Mol. Pharmacol. 1, 145 (1965)
- 95) H. Richtzenhain und P. Nippus, Chem. Ber. 82, 408 (1949)
- 96) E. Roberts und E.E. Turner, J. Chem. Soc. 1927, 1832
- 96a) J.A.S. Rokos, J. Chromatogr. 74, 357 (1972)
- 97) W. Schäfer, J. Geyer und R. Leute, Chem. Ber. 100, 930 (1967)

- 98) C.W. Schellhammer und S. Petersen, Justus Liebigs Ann. Chem. 624, 108 (1959)
- 99) L.H. Schmidt und G.R. Coatney, Am. J. Trop. Med. Hyg. 4, 208 (1955)
- 100) J.V. Schnell, W.A. Siddiqui und Q.M. Geiman, J. Med. Chem. 14, 1026 (1971)
- 101) F. Schönhöfer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 247, 1 (1942)
- 102) F. Schönhöfer und W. Schulemann, D.B.P. 1,186,861 (7. Okt. 1965)
Franz. Pat. M 2433, [C.A. 61, 13290 h (1964)]
Belg. Pat. 614.245, [C.A. 58, 3405 f (1963)]
- 103) L. Schrimpl, Dissertation, Erlangen 1968
- 104) G.R. Schröter, in: Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl - Müller), 4. Aufl., Bd. 11/1, S.576, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1957
- 105) W. Schulemann, Proc. R. Soc. Med. 25, 897 (1932)
- 106) W. Schulemann, F. Schönhöfer und A. Wingler, Klin. Wochenschr. 11, 381 (1932)
- 107) H.-R. Seidel, Dissertation, Erlangen 1973
- 108) M. Siegert, B. Alsleben, W. Liebenschütz und H. Remmer, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 247, 509 (1964)
- 109) A.J. Sheppard, W.D. Hubbard und A.R. Prosser, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 55, 660 (1972)
- 110) F.S. Skelton, C.M. Bowman, T.H. Porter und K. Folkers, Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 102 (1971)
- 111) F.S. Skelton, K.D. Linnam, K. Folkers, J.V. Schnell, W.A. Siddiqui und Q.M. Geiman, Biochemistry 8, 1284 (1969)
- 112) F.S. Skelton, P.J. Rietz und K. Folkers, J. Med. Chem. 13, 602 (1970)
- 113) K.H. Slotta und G. Szyszka, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 68, 184 (1935)

- 114) C.C. Smith, J. Pharmacol. Exp. Ther. 116, 67 (1956)
- 115) C.D. Snyder und H. Rapoport, J. Am. Chem. Soc. 94, 227 (1972)
- 116) E. Stahl, Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 1967
- 117) A.R. Tarlov, G.J. Brewer, P.E. Carson und A.S. Alving, Arch. Intern. Med. 109, 209 (1962)
- 118) C. Temple, Jr., J.D. Rose und J.A. Montgomery, a) J. Med. Chem. 17, 615 (1974); b) J. Med. Chem. 17, 972 (1974)
- 119) H.-J. Teuber und S. Benz, a) Chem. Ber. 100, 2077 (1967); b) Chem. Ber. 100, 2918 (1967)
- 120) H.-J. Teuber und N. Götz, Chem. Ber. 87, 1236 (1954)
- 121) P.E. Thompson und L.M. Werbel, Antimalarial Agents, Chemistry and Pharmacology. Medicinal Chemistry, Vol. 12, (Ed. G. DeStevens), Academic Press, New York und London 1972
- 122) H. Thoms, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 36, 1714 (1903)
- 123) Y.S. Tsizin und M.V. Rubtsov, Khim. Geterotsikl. Soedin. 1967, 285, ref. C.A. 70, 87520m (1969)
- 124) V. Ullrich, Angew. Chem. 84, 689 (1972)
- 125) Y.-P. Wan, T.H. Porter und K. Folkers, J. Heterocycl. Chem. 11, 519 (1974)
- 126) F. Weygand, G. Eberhardt, H. Linden, F. Schäfer und J. Eigen, Angew. Chem. 65, 525 (1953)
- 126a) J.P. Williams, J. Chromatogr. 36, 504 (1968)
- 127) D.E. Willis, Chromatographia 5, 42 (1972)
- 128) V.W. Winkler, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 56, 1277 (1973)
- 129) F.Y. Wiselogle, A Survey of Antimalarial Drugs 1941 - 1945, J.W. Edwards, Ann Arbor, Michigan, 1946
- 130) M.H. Wolf, Dissertation Erlangen, 1973

- 131) A. Wolff, Dissertation, Erlangen 1973
- 132) K.-P. Zeller, in: The Chemistry of Functional Groups. The Chemistry of the Quinoid Compounds (Ed. S. Patai), Part 1, S. 231, Interscience Publ., John Wiley & Sons, London - New York - Sidney - Toronto 1974
- 133) H. Zimmer, D.C. Lankin und S.W. Horgan, Chem. Rev. 71, 229 (1971)
- 134) R. Zimmermann, Dissertation, Erlangen 1971
- 135) Th. Zincke und Th. Cooksey, Justus Liebig's Ann. Chem. 255, 356 (1889)
- 136) L.H. Schmidt, Annual Progress Report (Project 2284-XXVIII), 1976, Kettering-Meyer Laboratory, Southern Research Institute, Birmingham, Alabama 35205
- 137) C. Temple, Jr., Privatmitteilung
-

LEBENS LAUF

Wolfgang Steuding

11. 2. 1946 Geboren in Erfurt/Thüringen als zweites von zwei Kindern; Vater: Willy Steuding, Fernsehtechniker, Mutter: Dorothea Steuding, geb. Pilz.
- 1952 - 1956 Besuch der Volksschule in Coburg.
- 1956 - 1965 Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums Ernestinum in Coburg.
20. 7. 1965 Abitur am Gymnasium Ernestinum in Coburg.
1. 10. 1965 - Apothekerpraktikant in der Stadtapotheke M. Schaller
30. 9. 1967 in Coburg.
5. 9. 1967 Pharmazeutische Vorprüfung in Bayreuth.
- Nov. 1967 - Studium der Pharmazie an der Universität
- Juli 1971 Erlangen-Nürnberg.
3. 8. 1968 Eheschließung mit Gisela Hub aus Coburg.
12. 11. 1971 Pharmazeutische Staatsprüfung in Erlangen.
- Ab 1. 12. 1971 Doktorand und wissenschaftliche Hilfskraft bei Professor Dr. O. Dann am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Angewandte Chemie, der Universität Erlangen-Nürnberg.
- Ab 1. 10. 1972 Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle.
28. 11. 1974 Approbation als Apotheker.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197